



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Efeito neuroprotetor da formononetina em modelo animal para estudo da doença de Parkinson

Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira

Aracaju – SE

2016

Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira

Efeito neuroprotetor da formononetina em modelo animal para estudo da doença de Parkinson

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Sergipe da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes

Aracaju – SE

2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48e Oliveira, Juciele Valéria Ribeiro de
Efeito neuroprotetor da formononetina em modelo animal para estudo da doença de Parkinson / Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira ; orientadora Margarete Zanardo Gomes. – Aracaju, 2016. 85 f. : il.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Biotecnologia farmacêutica. 2. Parkinson, Doença de. 3. Formononetina – Efeito fisiológico. 4. Antioxidantes. 5. Agentes antiinflamatórios. 6. Agentes neuroprotetores. I. Gomes, Margarete Zanardo, orient. II. Título.

CDU 606:615

Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira

Efeito neuroprotetor da formononetina em modelo animal para estudo da doença de Parkinson

Tese de doutorado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em biotecnologia.

Aprovada por:

Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes.
Orientadora

Profa. Dr. Francisco Prado Reis
Titular

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior
Titular

Profa. Dra. Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira
Titular

Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi
Titular

Aracaju – SE

2016

Aos meus pais, responsáveis pela construção do meu caráter, que sempre me apoiaram com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e pelas oportunidades de aprendizado e crescimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes, por suas orientações éticas, pela confiança e por suas contribuições no meu amadurecimento científico com seus ensinamentos, que tanto admiro e agradeço.

Ao neurocirurgião e mestre Hesmoney Ramos de Santa Rosa, a quem agradeço às primeiras inspirações e como maior influência no despertar científico na área da neurologia, com ética, inteligência e profissionalismo.

Ao médico Prof. Dr. Francisco do Prado Reis, pela oportunidade de aprendizado intenso e mergulho profundo na morfologia e neurociências; equânime aos grandes mestres.

À Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso, pela competente influência com informações embrionárias do projeto inicial e desenvolvimento posterior, com suas colocações precisas e objetivas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, pela disponibilização do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) do Instituto de Tecnologia e pesquisa ITP/UNIT, pelas recomendações apropriadas e pela visão prospectiva em suas colocações sempre concisas.

Ao Prof. Dr. Waldecy de Lucca Júnior, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Sergipe – UFS.

Ao Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO – Ponto Focal SE.

Aos membros da banca examinadora pela paciência em se disporem a analisar este trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO do ponto focal de Sergipe da Universidade Federal de Sergipe - UFS e da Universidade Tiradentes - UNIT.

Aos professores, técnicos e colegas de laboratórios nas pertinentes contribuições ao trabalho, como Rose Nely Pereira, Raquel Nunes, Isa Dórea, Sâmia Timani, Camila Dantas, Sheyla Barroso, Fanildes Moraes, Reinaldo Neto e Rafael Valois.

*“A marca da sua ignorância é a profundidade de sua crença
na injustiça e na tragédia. O que a lagarta chama de fim do
mundo, o mestre chama de borboleta.”*

Richard Bach

RESUMO

Considerando a demanda de tratamentos efetivos para prevenção e tratamento da doença de Parkinson (DP) e o papel do estresse oxidativo em distúrbios neurológicos e neurodegenerativos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, bem como a possível ação neuroprotetora *in vivo* do isoflavonóide formononetina (FORM) em modelo experimental para estudo da DP. Dentre os métodos usados para determinar a atividade antioxidante da FORM *in vitro*, foram eleitos o DPPH, o ABTS e o FRAP. Em ensaios *in vivo*, foi avaliada sua atividade biológica frente à lesão da via nigroestriatal causada por 6- hidroxidopamina (6-OHDA, 10 µg em 2 µL), com o lado direito utilizado como parâmetro para microinjeção no estriado. Animais controle receberam solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico. Os animais foram submetidos a teste comportamental de campo aberto, 21 dias após a cirurgia e procedeu-se à análise imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase (TH) e análise histoquímica (hematoxilina eosina) para avaliação de alterações estruturais e da resposta inflamatória, no estriado e na substância negra compacta (SNc), após eutanásia aos 28 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, à exceção do escore da resposta inflamatória, que foi analisado por meio de Teste Kruskal-Wallis, com extensão de Dunn. Nos resultados *in vitro*, através dos testes DPPH, ABTS e FRAP encontrou-se ação antioxidante de FORM semelhante à das vitaminas A e E e sinergismo entre a FORM e a vitamina A (por Equivalente de vitamina C e Trolox, $p < 0,001$). Nos resultados *in vivo*, para os testes de comportamento em campo aberto, foram avaliados os parâmetros de elevações (*rearing*), explorações (*crossing*), ambulações para a direita e esquerda, o tempo de imobilidade e de latência para início do movimento, sendo os resultados do grupo tratado com FORM a 20 mg/kg semelhantes aos do grupo não lesionado e diferentes dos grupos lesionados tratados com veículo e FORM a 10 mg/kg. Na imunomarcagem para TH na SNc, a 6-OHDA promoveu diminuição de neurônios, ficando remanescentes em média 22% no grupo lesionado e tratados com veículo, enquanto que o tratamento com FORM a 10 mg/kg promoveu aumento do número médio em 51% e o tratamento com FORM a 20 mg/kg em 79%. Os dados foram indicativos também de efeito anti-inflamatório da FORM, evidenciada na análise de infiltrado inflamatório microglial. Verificou-se que animais lesionados e tratados com veículo apresentaram grau severo de inflamação (mais de 50% de infiltrado inflamatório), o grupo controle apresentou menos de 10% de infiltrado inflamatório, enquanto nos grupos tratados com FORM (10 e 20 mg/kg) observou-se grau moderado de inflamação (10 a 50% de infiltrado $p < 0,0001$). Portanto, o tratamento com a FORM promoveu aumento na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e diminuiu a resposta inflamatória no estriado, efeitos que podem estar associados a sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Formononetina; Antioxidante; Anti-inflamatório e Neuroproteção.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antioxidant activity *in vitro*, as well as and the possible neuroprotective effect *in vivo* of the isoflavonoid formononetin (FORM) in an experimental model for the study of Parkinson's disease (PD). Among the methods used to determine the antioxidant activity of FORM *in vitro*, they were elected the DPPH, ABTS and FRAP. In the *in vivo* assays, FORM was evaluated for its biological activity on experimental PD induced by 6- hydroxydopamine (6-OHDA, 10 µg in 2 µL) injection in the right striatum. Control groups received saline containing 0.02% of ascorbic acid. The animals were subjected to the open field behavioral test after 21 days of surgery. The immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase TH was performed in the substantia nigra pars compacta (SNc) and the inflammatory response was evaluated at the striatum (hystochemical for hematoxylin eosin) after sacrifice 28 days of surgery. Statistical analysis was performed by one way analysis of variance or, in the case of graduated inflammatory response, by the Kruskal-Wallis test with Dunn's extension. The *in vitro* results of DPPH, ABTS and FRAP showed significant antioxidant action of FORM, similar to that of the vitamins A and E ($p > 0.05$) and synergism between FORM and vitamin A (for equivalent vitamin C and Trolox, $p < 0.001$). In the open field test the rearing, crossings, ambulation (to the right and left), the immobility time and latency to onset the movement were similar between the group treated with FORM 20 mg/kg and the lesioned group and different from the groups treated with vehicle and FORM 10 mg/kg. In immunostaining for TH SNc, it was observed that 6-OHDA caused a decrease in the mean number of dopaminergic neurons (22% remaining) in the lesioned group, whereas the treatment with FORM 10 mg/kg promoted an increase to 51% and FORM 20 mg/kg in 79%, $p < 0.0001$. The data were also indicative of anti-inflammatory action of FORM evidenced in histopathological analysis and by the reduction in the microglial inflammatory infiltrate. It was found that lesioned rats treated with vehicle exhibited severe grade of inflammatory response (more than 50% of the microglial infiltrate) while in the group without lesion less than 10% of inflammatory infiltrate. On the other hand, in the groups treated with FORM (10 and 20 mg/kg), there was a moderate inflammatory response, (10 to 50% infiltrate $p < 0.0001$). Therefore, the treatment with FORM promoted a neuroprotective and anti-inflammatory effects, which may be associated with high antioxidant activity.

Keywords: Nerve Degeneration; Flavonoids; Anti-inflammatory Agents; Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base..... | 21 |
| Figura 2: Determinação do comprimento de onda do radical livre DPPH..... | 53 |
| Figura 3: Resultados do teste DPPH..... | 54 |
| Figura 4: Resultados do teste ABTS..... | 55 |
| Figura 5: Resultados do teste FRAP | 56 |
| Figura 6: Resultados do teste de campo aberto..... | 61 |
| Figura 7: Análise da substância negra compacta..... | 64 |
| Figura 8: Análise do estriado..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ações neuroprotetoras descritas para isoflavonas36

Tabela 2: Esquema representativo da Linha do tempo de tratamentos e procedimentos59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AA: atividade antioxidante
ABTS: 2,2'-azinobis, 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AINES: anti-inflamatórios não esteróides
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
ATP: adenosina trifosfato
BHE: barreira hemato-encefálica
CL: corpúsculos (ou corpos) de *Lewy*
COMT: catecol-o-metil transferase
COX-2: ciclo-oxigenase 2
CPu: caudado-putâmen
D1: receptor dopaminérgico tipo 1
D2: receptor dopaminérgico tipo 2
DA: dopamina
DAB: tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DP: doença de Parkinson
DPPH: 2,2- difenil-1-picril-hidrazila
ERO: espécies reativas de oxigênio
ERN: espécies reativas de nitrogênio
FORM: formononetina
FRAP: solução aquosa de cloreto férrico
GABA: ácido gama-aminobutírico
GFAP: proteína fibrilar glial ácida
GPe: globo pálido externo
GPi: globo pálido interno
GPER: receptor de estrogênio acoplado à proteína G
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC₅₀: concentração inibitória em 50%
IL: Interleucina
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
i.p.: intraperitoneal
L-DOPA: 1,3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa
MAO: monoaminoxidase
MAO-A: isoforma A da monoaminoxidase
MAO-B: isoforma B da monoaminoxidase
MPP⁺: 1-metil-4-fenilpitidínio
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NB: Núcleos da Base
NF-κB, fator nuclear κB
NMDA: agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato
NO: Óxido Nítrico
OMS: Organização Mundial da Saúde
ONU: Organização das Nações Unidas
PBS: tampão fosfato

PI3K/Akt: fosfatidilinositol 3-cinase
PKA: proteína quinase A
p.o.: por via oral
RE- α : receptores estrogênicos alfa
TLR4: receptor *toll-like* 4
TRPV 1: receptor de potencial transitório vanilóide 1
6-OHDA: 6-Hidroxidopamina
SNC: Sistema Nervoso Central
SNc: Substância negra parte compacta
SNr: Substância Negra parte reticular
STN: Núcleo subtalâmico
STR: Estriado
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
Th: Tálamo
TH: Tirosina Hidroxilase
TPTZ: (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos | 16 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 Doença de Parkinson (DP)..... | 18 |
| 3.2 Fisiopatologia da DP..... | 24 |
| 3.2.1 Estresse Oxidativo..... | 24 |
| 3.2.2 Neuroinflamação..... | 26 |
| 3.2.3 Disfunções Mitocondriais..... | 29 |
| 3.2.4 Excitotoxicidade..... | 29 |
| 3.2.5 Agonistas de Estrogênio como Fatores Neuroprotetores..... | 31 |
| 3.4 Prováveis candidatos a agentes neuroprotetores: Isoflavonoides..... | 33 |
| 3.5 Formononetina (FORM)..... | 35 |
| 3.6 Modelos <i>in vivo</i> de indução da DP através da 6- hidroxidopamina (6-OHDA)..... | 38 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 Ensaios químicos para avaliação de atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 39 |
| 4.1.1 Concentração Inibitória..... | 40 |
| 4.1.2 Método DPPH..... | 41 |
| 4.1.3 Método ABTS..... | 41 |
| 4.1.4 Método FRAP..... | 42 |
| 4.1.5 Equipamento | 43 |
| 4.1.6 Reagentes..... | 43 |
| 4.1.7 Preparação de Amostras | 43 |
| 4.2 Ensaios biológicos <i>in vivo</i> | 44 |
| 4.2.1 Desenho Experimental..... | 44 |
| 4.2.2 Lesão da via nigroestriatal causada pela aplicação intraestriatal da toxina 6-OHDA..... | 46 |
| 4.2.3 Avaliação da função motora..... | 47 |
| 4.2.4 Avaliação histológica..... | 48 |
| 4.2.4.1 Reação Imunohistoquímica..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 4.2.4.2 Avaliação estrutural e da resposta inflamatória..... | 51 |
| 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 52 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1 Resultados dos ensaios <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.2 Resultados dos ensaios biológicos <i>in vivo</i> | 58 |
| 6 CONCLUSÕES | 71 |
| 7 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO..... | 72 |
| ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa..... | 81 |
| APÊNDICE 1 – Artigo publicado | 84 |
| APÊNDICE 2 – Patente Depositada | 85 |

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo e a neuroinflamação têm sido relacionados às neuropatologias degenerativas mais frequentes na população idosa, a exemplo da doença de Parkinson (DP) (HALLIWELL, 2006; WAJNER *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005; ZUGNO *et al.*, 2007). Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), existem cerca de quatro milhões de pessoas com DP no mundo e a estimativa é que esse número dobre até 2040 (ESA 2009; WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

Na DP, ocorre uma perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (WICHMANN e DELONG 2003; WAKADE and CHONG, 2014). A destruição desses neurônios resulta nas características clínicas fundamentais da doença como, a bradicinesia, tremores, acinesia, além de alteração da marcha e distúrbios cognitivos e emocionais (GARCÍA *et al.*, 2015).

Os eventos que resultam na morte neuronal dopaminérgica incluem a produção de mediadores pró-inflamatórios tóxicos pela micróglia, disfunção mitocondrial, proteólise, apoptose, excitotoxicidade e estresse oxidativo gerado por peroxidação lipídica, oxidação proteica e do DNA e oxidação química e enzimática da própria dopamina (JING *et al.*, 2015; KLAFKE *et al.*, 2012; PRU 2012; LIANG *et al.*, 2014; TORRES *et al.*, 2014; PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015).

O principal tratamento com o precursor dopaminérgico levodopa (L-DOPA) produz efeitos colaterais como náuseas, arritmias cardíacas, insônia, ansiedade e depressão (HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011), além

de ocasionar o aparecimento de flutuações motoras debilitantes conhecidas como discinesias (PADOVAN-NETO *et al.*, 2015; RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2015).

Diante da demanda por tratamentos efetivos, estudos sobre a ação neuroprotetora de componentes bioativos de produtos naturais podem fornecer subsídios no desenvolvimento de possíveis novos fármacos para profilaxia e terapêutica da DP. A FORM presente em produtos naturais como a própolis vermelha (CAÍDO *et al.*, 2011; LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015) apresentou ação neuroprotetora *in vitro* e *in vivo* (LI *et al.*, 2014), frente à isquemia induzida por oclusão arterial no encéfalo, diminuindo a apoptose e aumentando a ação antioxidante endógena (WANG *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2014). Após trauma encefálico em roedores, a FORM aumentou a atividade de enzimas com ação antioxidante e diminuiu os níveis de marcadores inflamatórios, ao mesmo tempo em que diminuiu a hidrocefalia e lesão neural após lesão (ZHU *et al.*, 2014).

Portanto, considerando a fisiopatologia da DP e as ações descritas para a FORM, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante *in vitro* deste composto e seu efeito neuroprotetor em modelo experimental para estudo da DP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a ação da FORM enquanto agente neuroprotetor.

2.2 Objetivos Específicos:

- Analisar as propriedades antioxidantes da FORM *in vitro*;
- Analisar o comportamento animal após lesão e tratamento com FORM, em modelo experimental para estudo da doença de Parkinson;
- Avaliar a resposta inflamatória e a morfologia do tecido neuronal através de análise histopatológica com a coloração hematoxilina-eosina (HE);
- Avaliar a atividade neuroprotetora da FORM frente à morte neuronal dopaminérgica por meio da análise imunohistoquímica de expressão da enzima tirosina-hidroxilase (TH).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doença de Parkinson (DP)

A DP é considerada uma doença neurodegenerativa progressiva, incapacitante, que acomete principalmente idosos (CHUNG *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009). É identificada neste contexto como a segunda desordem mais frequente, depois da doença de Alzheimer (WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

O envelhecimento causa transformações na vida, nas relações interpessoais, sociais e econômicas, contudo, quando associado às doenças crônicas, altera de forma significativa a qualidade de vida, a independência e autonomia do indivíduo (ZASLAVSKY, 2002).

A população idosa no Brasil tem aumentado em relação à população em geral, e este tem sido um dos fatores que mais tem influenciado na incidência das doenças crônico-degenerativas (GUS, 2007), a exemplo das doenças cardiovasculares, musculoesqueléticas e neurológicas; principais morbidades que acometem a população (WICHMANN e DELONG, 2003; ZASLAVSKY, 2002).

Segundo a *Economic and Social Affairs* (ESA), o Brasil está entre os 10 países do mundo com maior população de indivíduos acima dos 60 anos de idade. Além disso, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) informam que a expectativa de vida atual do brasileiro é de 73,8 anos, em média, sendo de 71,2 anos para homens e de 78,3 anos para mulheres. Já para 2020, a estimativa é de que o país possua uma população com expectativa média de 76,6 anos; sendo de 74,7 anos para os homens e 79,2 anos para a mulheres (IBGE, 2010; ESA, 2009).

Não existem números exatos sobre a DP no Brasil, entretanto, o Ministério da Saúde estima que existam cerca de 200 mil pessoas com a doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de 1 a 2% da população mundial acima dos 65 anos possuem a doença, com a estimativa de 4,1 a 4,6 milhões de indivíduos doentes, e estima-se que até o ano de 2030 a incidência da doença seja de 8,7 a 9,3 milhões de casos no mundo (IBGE, 2010).

A DP é caracterizada pela perda contínua de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra e degeneração da via nigroestriatal. Em adição, outras vias catecolaminérgicas podem estar comprometidas, como as projeções de neurônios que sintetizam serotonina, noradrenalina e acetilcolina (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; DEUMENS; BLOKLAND and PRICKAERTS, 2002).

A degeneração de células dopaminérgicas mesencefálicas provoca uma depleção significativa de dopamina no corpo estriado, e estima-se a diminuição de dopamina no estriado na ordem de 80% do normal, quando os sintomas tornam-se aparentes, associados principalmente à desinibição da via indireta do circuito dos núcleos da base (NB) (DEUMENS; BLOKLAND and PRICKAERTS, 2002).

Como resultado da depleção dopaminérgica, ocorre uma redução da atividade de neurônios estriatais de projeção que formam a via direta e um aumento na atividade dos que formam a via indireta, gerando as hipocinesias características da DP (BEDIN and FERRAZ, 2003).

Os NB constituem conjuntos de corpos celulares subcorticais interconectados, envolvidos no controle dos movimentos. Também estão

organizados em diferentes circuitos neurais para a formação da memória, cognição, emoção e do aprendizado (WANG *et al.*, 2015).

O córtex motor primário do cérebro é a principal aferência excitatória dos circuitos dos NB. O estriado é o principal núcleo de entrada do circuito, através do qual tem aferência um grande fluxo de informações provenientes de múltiplas áreas corticais motoras e sensitivas, estabelecendo conexões sinápticas excitatórias glutamatérgicas com neurônios gabaérgicos espinhosos médios. Esses neurônios estriatais dão origem a duas vias de saída para o tálamo, à via direta e indireta (ROUSE *et al.*, 2000; WICHMANN and DELONG, 2003).

As vias direta e indireta dos NB atuam como mecanismo de fino ajuste no controle do movimento. As duas vias seguem em direção ao globo pálido de forma distinta. Na via direta, os axônios dos neurônios espinhosos médios liberam o neuropeptídeo substância P, a dinorfina e o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), que vai inibir os neurônios gabaérgicos localizados no globo pálido interno (GPi) e na parte reticulada da substância negra (SNr), atuando como uma via facilitadora em direção ao tálamo. Assim, estes núcleos de saída reduzem sua ação inibitória sobre o tálamo e, uma vez desinibido, o tálamo estimula as áreas corticais e facilita a realização do movimento (OBESO *et al.*, 2008).

Na via indireta, os neurônios estriatais gabaérgicos contém encefalina e neurotensina, que se projetam para o segmento externo do globo pálido (GPe). Ao serem inibidos, permitem que o núcleo subtalâmico libere o aminoácido excitatório glutamato no GPi, excitando assim os neurônios gabaérgicos que vão inibir os neurônios do tálamo (OBESO *et al.*, 2008). Neste caso a via é inibidora.

Figura 1. Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base. Setas vermelhas indicam a via direta e as setas amarelas, a via indireta. O sinal positivo (+) indica ação excitatória e negativo (-) inibitória: T: tálamo; CPu: caudado-putamen; SNc: substância negra compacta e SNr: substância negra reticulada; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno, NS: núcleo subtalâmico.

Fonte: Adaptado de Kandel, Schwartz and Jessell, 2000.

As sinapses finais geradas pelo GPi e pela SNr são inibitórias e, atuando em vias diferentes, facilitam os movimentos voluntários e inibem os movimentos indesejados (KANDEL, SCHWARTZ e JESSELL, 2000).

Esse modelo de função dos núcleos basais tem sido útil para desenvolver uma compreensão sobre o modo pelo qual estas estruturas atuam. Uma importante dedução feita com base nesse modelo é a de que, na DP, a via indireta que faz sinapses no núcleo subtalâmico deve estar hiperativa (WAKADE and CHONG, 2014).

Desta forma, a dopamina (DA) tem sido o neurotransmissor utilizado como alvo terapêutico para alguns dos distúrbios importantes do sistema nervoso central (SNC), incluindo a DP e a esquizofrenia. A DA também é um precursor dos outros neurotransmissores da classe das catecolaminas, a norepinefrina e a epinefrina. O mecanismo envolvido na neurotransmissão das catecolaminas possui diversos componentes, que são compartilhados entre os membros da classe, incluindo enzimas de biossíntese e vias metabólicas (CÔTÉ *et al.*, 2015).

Outra característica encontrada em pacientes com DP é a presença de inclusões citoplasmáticas neuronais, denominadas corpos de *Lewy* (CL), em alguns neurônios dopaminérgicos. Estas estruturas representam a

particularidade neuropatológica mais importante da DP e são caracterizadas pela presença de agregados proteicos, com organização estrutural de densidade hialina, compostos por: parkina, ubiquitina, neurofilamentos e pela proteína alfa-sinucleína (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; MEREDITH *et al.*, 2008; DEVIC *et al.*, 2011).

3.2 Fisiopatologia da DP

Fatores como o estresse oxidativo e a inflamação tem sido observados na etiologia de várias doenças neurodegenerativas, inclusive a DP (JING *et al.*, 2015).

Tem sido identificados também, disfunções genéticas, aumento da permeabilidade aos íons cálcio (gerador de disfunções mitocondriais em neurônios), excitotoxicidade, regulação da ação de mediadores proteicos citotóxicos em células neuronais após hipóxia, regulação negativa dos genes pró-apoptóticos, pela ativação das caspases 3 e 9, e fatores relacionados ao gênero onde o estrogênio apresenta ação protetora (KLAFKE *et al.*, 2012; PRU, *et al.*, 2012; LIANG, *et al.*, 2014; TORRES *et al.*, 2014; PHANIENDRA, JESTADI and PERIYASAMY, 2015).

3.2.1 Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO e ERN), ou conhecidas como radicais livres, existem normalmente no organismo e ajudam na regulação na atividade de proteínas, nas ações de fagocitose e sinalização celular (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2006; NISHIO *et al.*, 2013).

Contudo, quando em excesso, geram o fenômeno do estresse oxidativo, considerado um desequilíbrio entre o balanço pró-

oxidante/antioxidante, relacionado com a fisiopatologia de várias doenças crônico-degenerativas (KIM *et al.*, 2002; PHANIENDRA, JESTADI and PERIYASAMY, 2015).

Assim, o desenvolvimento de fármacos com ação antioxidante e o nível de antioxidantes presentes nos alimentos vem sendo estudados, na busca de redução da oxidação biológica, da inflamação e de combate a algumas doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, catarata, doenças neurodegenerativas, neuroisquêmicas, cirrose hepática e infecções virais (AMES, 1998; UZOGARA, 2000; ATKIN *et al.*, 2005; YAMAGATA *et al.*, 2010; RENDA *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo é um importante fator a ser analisado no processo degenerativo da DP. Muitas reações celulares utilizam o oxigênio molecular para catálise e produção de energia. Essas reações produzem ERO ou radicais livres, como superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO), que em altas concentrações são prejudiciais para as membranas celulares e podem ocasionar a morte celular (MILLER *et al.*, 2009).

O tecido cerebral é rico em catecolaminas e excepcionalmente vulnerável à geração de radicais livres. Por sua vez, a peroxidação lipídica ocasionada por ERO leva à perda progressiva da fluidez da membrana neuronal e aumenta a permeabilidade a íons cálcio, principalmente em regiões do cérebro tais como o hipocampo, SNc e corpo estriado, que são particularmente susceptíveis ao ataque por ERO, devido à presença de elevado teor de lipídios, alto consumo de oxigênio e níveis baixos de enzimas antioxidantes (SEVCSIK *et al.*, 2011).

O NO é um gás altamente difusível, solúvel em lipídios e produzido por diferentes tipos celulares do organismo humano e de outros animais. Tem sido reconhecido como um mediador neuronal. A distribuição dos neurônios que apresentam o NO pode ser analisada por métodos histoquímicos (evidenciação de atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase – NADPH-d) e por métodos imuno-histoquímicos (evidenciação da enzima de síntese do óxido nítrico neuronal – NOS neuronal) (PADOVAN-NETO *et al.*, 2015).

No encéfalo, o NO apresenta uma grande variedade de efeitos biológicos, implicados no controle do fluxo sanguíneo e da expressão genética. O NO produzido pelos astrócitos e pelas terminações nervosas favorecem a adequação entre o fluxo sanguíneo vascular e a função parenquimatosa, já que os astrócitos fazem parte da bainha perivascular cerebral que regula a passagem de substâncias do sangue para o interstício cerebral (FREITAS *et al.*, 2002).

Como substância mediadora, o NO participa da comunicação neuronal, da plasticidade sináptica e modula a resposta neuronal do sistema visual, regula a sobrevivência e a morte celular, além de atuar como neurotransmissor. Por seus efeitos sobre a liberação de neurotransmissores como o glutamato, acredita-se que o NO tenha, juntamente com o monóxido de carbono, importante papel na formação da memória, no aprendizado, na agressividade e sexualidade. Inibidores de enzimas de síntese de NO atenuam as discinesias induzidas por L-DOPA sem comprometer a recuperação funcional promovida por este fármaco (PADOVAN-NETO *et al.*, 2015).

Na DP os danos causados pelo estresse oxidativo interferem nas funções celulares, tornando difícil determinar se o estresse oxidativo conduz, ou é uma consequência do processo degenerativo (WAKADE and CHONG, 2014).

No entanto, foi observado que ocorre aumento da expressão da enzima de síntese de NO, isoforma neuronal, bem como da atividade NADPH-d, em modelo experimental para estudo da DP e que a inibição da síntese de NO conferiu efeito neuroprotetor diminuindo a morte neuronal DA (GOMES, RAISMAN-VOZARI and DEL BEL, 2008).

3.2.2 Neuroinflamação

Estudos evidenciam que a inflamação constitui também outro mecanismo importante envolvido no desenvolvimento e progressão da DP. A resposta imune local no encéfalo depende da síntese de componentes inflamatórios pelas células microgliais, como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas, ERO e ERN (BURGUILLOS *et al.*, 2015).

Neste contexto, foram identificados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, citocinas associadas à ativação de células T, citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento; uma das principais características que sustentam a relação entre neuroinflamação e DP, em estudos pré-clínicos com animais (CHEN *et al.*, 2012; CHINTA *et al.*, 2013).

A ativação da micróglia pode dar início a diversas funções do sistema imune, tais como a fagocitose e produção de citocinas (FURR, MARRIOTT, 2012). A ativação microglial leva à neuroinflamação, mediada pelas ERO'S, que provocam lesões nos astrócitos; que são células gliais relacionadas à barreira hemato-encefálica (BHE) (MAES, TWISK and RINGEL, 2012).

Esta exposição à inflamação de forma crônica pode levar à persistência de alterações na função da dopamina dos NB, refletida clinicamente pela anedonia, ou seja, perda da capacidade de sentir prazer para realizar a

maioria das atividades; incluindo fadiga, lentidão psicomotora, redução da resposta neural à recompensa hedônica, diminuição de metabólitos de dopamina e aumento da captação pré-sináptica (SINGH *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2013).

Estudo de XIMENES *et al.* (2015) mostrou que a inflamação mediada por células microgliais e astrócitos é um processo que contribui para a morte de neurônios dopaminérgicos no encéfalo, utilizando modelo de estudo da DP pela aplicação de 6-OHDA, observada na expressão imunológica de macrófagos através de proteínas de filamentos intermediários do citoesqueleto, como a proteína fibrilar glial ácida (GFAP).

Os astrócitos estão vulneráveis também ao estresse oxidativo. Neste sentido, enzimas responsáveis pela defesa antioxidante nos astrócitos, como superóxido dismutase, catalase e glutatona oxidada podem controlar a produção dos radicais livres quando em níveis normais. Quando os níveis destas enzimas estão baixos, os astrócitos ficam suscetíveis ao dano oxidativo, como observado em cultura de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar (BELLAYER *et al.*, 2014, SAMPEDRO-PIQUERO *et al.*, 2014).

A degeneração e atrofia astrogliar têm sido detectadas nas fases iniciais de neuropatologias degenerativas (RODRIGUEZ *et al.*, 2014), assim como, mudanças no citoesqueleto (actina) dos astrócitos têm sido relacionadas a funções como sinalização de cálcio, homeostase iônica e transporte de glutamato (SOUZA *et al.*, 2013).

Ainda quanto à atividade de enzimas, foi verificado que a galectina-3 está ausente em cérebros saudáveis, mas presente em cérebros com inflamação em curso e foi mostrado também que ela é secretada por células microgliais,

liga-se ao receptor *toll-like* 4 (TLR4) e amplifica as reações que levam à inflamação (JING *et al.*, 2015; BURGUILLOS *et al.*, 2011; BURGUILLOS *et al.*, 2015).

Desta forma, estudos utilizando os biomarcadores da inflamação, a exemplo das caspases e da galectina, poderão auxiliar no desenvolvimento de terapêuticas mais adequadas contra o processo inflamatório e suas possíveis consequências (MICHAUD *et al.*, 2013).

Em doenças neurológicas, como Alzheimer e Parkinson ainda não é possível confirmar se a inflamação constitui fator desencadeante destas, ou se as respostas inflamatórias contribuem para sua progressão. Apesar da ativação da micróglia induzir a liberação fisiológica de várias citocinas, tais como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucinas, 1, 2 e 6 (IL1, IL2, IL6) e NO, ainda não está claro se ocorre ativação pró-inflamatória e/ou inibição anti-inflamatória na produção de lesão celular e degeneração neuronal (EDISON *et al.*, 2013).

3.2.3 Disfunções Mitocondriais

As ERRO'S podem gerar lesão mitocondrial, lesão da membrana plasmática ou mesmo lesão no DNA celular. Estas lesões podem desencadear processos autoimunes, com a produção de citocinas pró-inflamatórias (MICHAUD *et al.*, 2013).

A maioria das ERO'S intracelulares são derivadas das mitocôndrias, a exemplo dos radicais superóxido que são produzidos em dois locais importantes na cadeia de transporte de elétrons, ou seja, complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinona citocromo c redutase). Quando células neurais são comprometidas por um evento isquêmico, geralmente

entram em necrose, como também podem sofrer uma morte programada, por apoptose, na zona de penumbra vizinha (DU *et al.*, 2013).

De acordo com Gandhi e Wood (2005), toxinas ambientais podem agir por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial causando seletiva degeneração dopaminérgica e acúmulo de inclusões citoplasmáticas com ubiquitina e alfa-sinucleína, no desenvolvimento da DP.

3.2.4 Excitotoxicidade

Uma das principais causas de morte celular é a excitotoxicidade induzida por glutamato, principal neurotransmissor excitatório, responsável por um terço de todas as sinapses do SNC. Concentrações excitotóxicas de glutamato causam a despolarização excessiva do neurônio pós sináptico, gerando distúrbios da homeostasia iônica e energética, com consequente aumento na concentração de cálcio intracelular. Assim, observa-se geração de radicais livres e lesão mitocondrial, podendo ser causa de morte celular (RUBIO-OSORNIO *et al.*, 2009).

O glutamato e a proteína beta-amilóide podem também induzir acúmulo intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ERO, causando danos às células neuronais. Então, a ação do H_2O_2 em mediar aceleração do influxo de cálcio e de interagir com ferro para gerar estresse oxidativo tem sido associados com doenças neurodegenerativas (OCCHIUTO *et al.*, 2009).

Já o ferro, metal fundamental para a homeostase do organismo, quando em excesso, passa a desencadear reações oxidativas, aumentando o estresse oxidativo. Um desequilíbrio entre a formação de radicais livres leva a alterações na conformação de proteínas e aumento de sua agregabilidade, à

formação de fibrilas e, por fim, à neurodegeneração (WICHMANN and DELONG, 2003; HEISTERS, 2011; WANG *et al.*, 2015).

Os níveis de ferro no encéfalo estão significativamente aumentados nos pacientes com a DP e a deposição de ferro é observada na SN destes pacientes (YOU *et al.*, 2015).

Além disso, os achados sugerem que o aumento de ferro nigral exacerba os níveis de estresse oxidativo, que promove apoptose através da ativação de caspase (WAKADE and CHONG, 2014).

3.2.5 Agonistas de Estrogênio como Fatores Neuroprotetores

A prevalência da DP manteve-se inalterada durante os últimos 40 anos e não há diferenças raciais evidentes, no entanto, a prevalência desta enfermidade foi apontada como maior em homens que em mulheres. A maior exposição a toxinas ocupacionais em indivíduos do gênero masculino e possíveis efeitos protetores do estrogênio, com propriedade antioxidante, para o gênero feminino, surgem como justificativas possíveis, conforme estudos experimentais pré-clínicos (MU *et al.*, 2009; WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

Assim, o estrogênio relaciona-se com a neuroproteção, regulando as vias de sinalização inflamatórias e de mediadores anti-apoptóticos, a exemplo do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), incluindo a proteína quinase A (PKA), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (AL *et al.*, 2012).

A PKA é conhecida por bloquear a apoptose através fosforilação de várias moléculas de sinalização, incluindo inibição da via de morte celular pela enzima caspase-9. Estes fatores, por sua vez, regulam a ativação ou inativação de sobrevivência celular e morte. Assim, há evidências de que a PKA esteja

ligada à sobrevivência de células neuronais e/ou morte celular, sendo esta proteína cada vez mais pesquisada nos acidentes vasculares cerebrais (AVC) (BRANN *et al.*, 2012).

3.3 Tratamento Medicamentoso da DP com a L-DOPA

Os tratamentos disponíveis para a DP permitem tratar os sintomas e não existe nenhuma terapia disponível que possa reverter a progressão da doença, regenerar ou interromper a morte neuronal. Contudo, os sintomas podem ser controlados com a administração de drogas que têm por objetivo aumentar os níveis de DA no encéfalo ou simular os efeitos desse neurotransmissor (SINGH *et al.*, 2007).

As estratégias utilizadas para o tratamento da DP baseiam-se em terapias de reposição dopaminérgica (incluindo aquelas que visam gerir ou prevenir o aparecimento de complicações motoras), na identificação de drogas não dopaminérgicas e na descoberta de compostos para modificar o curso da doença (RUBIN *et al.*, 2006; GEORGIEV *et al.*, 2015).

O tratamento medicamentoso para DP foi introduzido no final da década de 1960, por George Cotzias, com o uso do precursor da dopamina 3,4-dihidroxifenilalanina (Levodopa ou L-DOPA), substância precursora da dopamina e permanece até os dias atuais como a droga mais utilizada no tratamento sintomático da DP (HEISTERS *et al.*, 2011).

Embora a L-DOPA seja considerada a droga mais efetiva para o controle dos sintomas motores, o uso prolongado leva ao aparecimento de complicações que envolvem discinesias (movimentos involuntários anormais) e flutuações motoras “*on-off*” (oscilações no desempenho de movimentos), especialmente nos estágios avançados da DP (OBESO *et al.*, 2000).

No início do tratamento os pacientes com DP recebem doses baixas para minimizar os efeitos colaterais do medicamento, mas é necessário aumentar a dose de L-DOPA após o prazo inicial de 5 anos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003). Além desses problemas, pode ocorrer disfunção autonômica, congelamento da marcha, desequilíbrio e complicações neuropsiquiátricas em cerca de 40% dos pacientes.

Segundo Rao *et al.* (2006) a L-DOPA é eficaz no controle da bradicinesia e na rigidez. No entanto, no que diz respeito à fala, ao reflexo postural e às alterações na marcha, a medicação é menos propensa a responder. A L-DOPA é administrada junto com a carbidopa para evitar a conversão periférica de L-DOPA em dopamina pela dopa-descarboxilase, aumentando assim o conteúdo de DA cerebral (RAMIREZ-GARCIA, PALAFOX-SANCHEZ and LIMON, 2015).

Após a administração da L-DOPA por via oral apenas uma pequena porção da dose penetra no SNC inalterada. Assim, é necessária uma dose elevada para obter o efeito desejado, conseqüentemente, ocorrem alguns efeitos colaterais como náuseas, vômitos, arritmias cardíacas, agitação, insônia, ansiedade e depressão estão associadas ao uso do L-DOPA (HEISTERS *et al.*, 2011).

Além da L-DOPA, outras drogas são incluídas no tratamento da DP como agonistas de receptores de DA, selegilina, amantadina e inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT) (SINGH, PILLAY and YAHYA, 2007).

Além de perturbações motoras, outros sintomas são encontrados na fase inicial da DP, como déficits na aprendizagem e memória, uma vez que a via nigro-estriato-cortical faz parte do circuito neuronal de processos cognitivos,

como exemplo da memória espacial de trabalho e mesmo quando os pacientes estão recebendo o tratamento com L-DOPA, a disfunção cognitiva pode aparecer (CAVAILLON, 2005; EDISON *et al.*, 2013).

Há evidências que radicais livres são gerados no metabolismo da dopamina formada por L-DOPA, a exemplo do óxido nítrico, que pode provocar danos nessa via através do estresse oxidativo (RAMIREZ-GARCIA, PALAFOX-SANCHEZ and LIMON, 2015).

Estes dados podem fornecer subsídios para a argumentação que o tratamento medicamentoso com L-DOPA provoca como um dos efeitos colaterais o déficit cognitivo (YOKOYAMA *et al.*, 2011; RAO, HOFMANN and SHAKIL, 2006; BASTIDE *et al.*, 2015).

Na DP, o tratamento crônico com L-DOPA é acompanhado por um aumento nos níveis de homocisteína, o que implica um risco adicional para a doença em si e para o prejuízo cognitivo. Além disso, no metabolismo da homocisteína, as vitaminas B12, B6 e o folato estão envolvidos como co-fatores. A deficiência em um destes co-fatores pode contribuir para o aumento de homocisteína, o que exige a consideração de que é desejável a adição de suplementos de vitaminas envolvidas no metabolismo da homocisteína na dieta de pacientes com DP que estão recebendo tratamento com L-DOPA (MARTÍN-FERNÁNDEZ, MARTÍNEZ and DIES, 2015).

3.4 Prováveis candidatos a agentes neuroprotetores: Isoflavonoides

Os Produtos naturais têm sido cada vez mais explorados pela população e pela área científica por apresentarem composição rica em substâncias diversificadas, importantes para a manutenção da saúde (SCHMITT *et al.*, 2011, ALMEIDA *et al.*, 2015), a exemplo dos isoflavonoides.

O efeito neuroprotetor dos isoflavonoides biochanina A, FORM, daidzeína e genisteína tem sido estudado em diversos modelos de lesão neuronal, pelo fato de estas substâncias possuírem ações antioxidante e anti-inflamatória, e elas estão sendo utilizados na tentativa de desenvolvimento de possíveis tratamentos para várias patologias, inclusive doenças neurológicas, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Ações neuroprotetoras descritas para isoflavonas.

| Referência | Produto | Modelo | Efeitos sobre a lesão |
|-----------------------------|---------------|--|---|
| ARAS <i>et al.</i> , 2015 | Daidzeína | Isquemia cerebral em ratos | Redução da produção de espécies reativas de oxigênio: Aumento dos níveis de superóxido dismutase e fator de respiração nuclear 1 (NRF-1); Diminuição no níveis de de malondialdeído e de expressão das caspases 3 e 9; Diminuição do dano tecidual. |
| CHINTA <i>et al.</i> , 2013 | Daidzeína | Cultivo de células microgliais murinas expostas a lipopolissacarídeos | Diminuição da produção de óxido nítrico e nitritos, diminuição da expressão de iNOS e de IL-6, diminuição da fosforilação de MAPK p38 e da ativação NF- κ B |
| STOUT <i>et al.</i> , 2013 | Daidzeína | Acidente vascular encefálico em ratos | Recuperação funcional |
| RIVERA <i>et al.</i> , 2013 | Daidzeína | Falha na neurogênese induzida por obesidade em ratos | Diminuição da expressão de caspase 3 (apoptose), do fator de recompensa alimentar, de GFAP (ativação astrogliar) aumento da proliferação celular no hipocampo |
| YANG <i>et al.</i> , 2012 | Daidzeína | Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal | Neuritogênese dependente de proteína quinase C, proteína quinase ativada por mitógeno e quinase reguladora de sinal extracelular (MEK/ERK) |
| LIANG <i>et al.</i> , 2014 | Formononetina | Isquemia induzida por oclusão arterial no encéfalo | Diminuição da razão das proteínas cinases fosforiladas Bax (ativadora de apoptose) e Bcl-2 (inibidor da ativação de apoptose) e aumento da via de sinalização de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K/Akt) |
| LI <i>et al.</i> , 2014 | Formononetina | Trauma encefálico em roedores | Aumento das atividades glutatona peroxidase e superóxido dismutase, diminuição dos níveis de malonaldeído, ciclooxigenase 2 (COX-2), TNF- α e as concentrações de IL-6, diminuição da hidrocefalia e lesão neural |
| TIAN <i>et al.</i> , 2013 | Formononetina | Neurotoxicidade induzida por agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios corticais | Diminuição do número de células em apoptose, aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição dos níveis de Bax e caspase-3. |
| WANG <i>et al.</i> , 2015 | Biochanina A | Lesão isquêmica em ratos | Diminuição do volume do edema, melhora no desempenho funcional, diminuição dos níveis de |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|---|
| | | | mediadores inflamatórios mieloperoxidase (MPO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β e da fosforilação da proteína mediadora pró-inflamatória p-38 |
| OCCHIUTO <i>et al.</i> , 2009 | Biochanina A, formononetina, daidzeína e genisteína | neurônios em cultura expostos à toxicidade glutamatérgica | diminuiu a apoptose |

Em adição, estudos tem mostrado a ação do H₂O₂ em mediar aceleração do influxo de cálcio e de interagir com ferro para gerar para o estresse oxidativo, foi reduzida com o pré-tratamento com o extrato de isoflavonas (OCCHIUTO *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2014; BAR-AMA *et al.*, 2015; FUNAKOSHITAGO *et al.*, 2015).

3.5 Formononetina (FORM)

Os flavonóides são compostos fenólicos derivados de plantas que atuam em diferentes processos fisiológicos. De acordo com as características biossintéticas e químicas da FORM, ela é classificada como isoflavona (MANACH *et al.*, 2004; AUYEUNG, LAW and KO, 2012; ANDERSEN *et al.*, 2014).

A FORM está presente em produtos naturais, como na própolis vermelha (*Dalbergia ecastophyllum*), trevo-dos-prados (*Trifolium pratense* ou *canescens*), soja (*Glycine max*), semente do linho ou linhaça (*Linum usitatissimum*), erva de São Cristóvão ou *black cohosh* (*Cimifuga racemosa*), astrágalo (*Radix astragali*), suco de uva (*Vitis vinifera*), chá verde (*Camellia sinensis*) e café (*Coffea arabica*) (CHEN *et al.*, 2008; CAÍDO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011; SAPOZHNIKOVA, 2014).

As isoflavonas são os flavonoides com melhor perfil de biodisponibilidade. Após absorção intestinal, são rapidamente distribuídas para

os tecidos, a partir do plasma e eliminadas pelos rins e pela vesícula biliar (MANACH *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010).

O trevo vermelho tem sido a principal fonte de FORM atualmente, por ser cultivado principalmente como planta forrageira e com capacidade de produção em larga escala. Este trevo foi originalmente também utilizado para fins medicinais para o tratamento de alguns sintomas, tais como tosse e eczema. Nos últimos anos, tem sido utilizado na terapia de reposição hormonal alternativa do estrogênio na menopausa (PILSÁKOVÁ *et al.*, 2010; KRÄHMER *et al.*, 2013).

Crescentes evidências sugerem que o estradiol e fitoestrógenos exercem efeitos neuroprotetores na isquemia cerebral focal e global. Estudo com FORM, como fitoestrogênio, mostrou melhorar a função cerebral em área lesada após isquemia cerebral em ratas ovariectomizadas (PRU *et al.*, 2012).

A FORM exibiu uma regulação positiva em receptores estrogênicos alfa (RE- α) e na atividade de proteína quinase A e B (PKA e PKB), que inibem processos de apoptose, os quais são responsáveis pela ativação ou inativação da permeabilidade mitocondrial aos íons cálcio e hidrogênio, no controle do pH, e na liberação de citocromo c no citosol da célula, que pode induzir a apoptose pela ativação das caspases 3 e 9 (PRU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015).

Assim, ao diminuir o acúmulo de ERO, as isoflavonas não só protegem a integridade das células, como também, podem atuar como agonistas de estrogênio, na ativação da via de sinalização intracelular, que conduz à ativação do fator de transcrição e ao gene de transcrição, que são potencialmente protetores da integridade da membrana mitocondrial neuronal (OCCHIUTO *et al.*, 2009; PHANIENDRA, JESTADI and PERIYASAMY, 2015).

Os flavonoides são capazes de atenuar ou modificar a transmissão glutamatérgica (KLAFKE *et al.*, 2012). Assim, os efeitos analgésicos descritos para a FORM em resposta ao glutamato podem estar relacionados com a sua atividade antioxidante (LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015; FROZZA *et al.*, 2013; RIGHI *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2013).

Quanto à relação entre vascularização, inflamação e neuroproteção, em estudos com modelo animal de isquemia por oclusão da artéria cerebral média, observou-se que o tratamento com FORM preveniu a apoptose das células nervosas na área de penumbra de isquemia e inibiu a resposta inflamatória durante a fase aguda da inflamação. Desta forma, presume-se um mecanismo de proteção por tratamento com a FORM após revascularização (DU *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014; SCONECE *et al.*, 2015). Em outro estudo, LAI *et al.* (2013) demonstraram que a FORM previniu aumento do volume de edema cerebral, e melhorou o déficit neurológico, em modelo animal de isquemia.

Outros trabalhos verificaram que a FORM contribui para prevenir a apoptose, através fosforilação de moléculas de sinalização, incluindo inativação genética do membro da família do gene Bcl-2 (BRANN *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2014; BIALESOVA *et al.*, 2015). E ainda, estudo com ensaio biológico de extratos herbais que possuem esse flavonóide mostraram que a FORM proporcionou efeito antiamnésico mediado pela ação antioxidante (HAN, ZHANG and SKIBSTED, 2012).

A FORM mostrou efeito na prevenção da neurodegeneração, comparável ao da curcumina, atribuído à propriedade antioxidante (AGRAWAL *et al.*, 2012); e semelhante ao da sesamina como adjuvante na terapêutica na

DP, ao reduzir a citotoxicidade através da inibição de caspase-3 em sistemas neuronais dopaminérgicos, em modelo animal (PARK *et al.*, 2014).

Quanto à metabolização biológica, a FORM apresenta a vantagem de ser absorvida por via oral, mesmo havendo a conversão em daidzeína por primeira passagem hepática ou em segunda passagem por via intraperitoneal, sendo esses flavonoides geralmente conjugados no fígado e, em menor medida nos rins. Assim, estas substâncias são excretadas na bile e na urina, não havendo acúmulo ou retenção orgânica (PETERSON and J. DWYER, 1998).

3.6 Modelo *in vivo* de lesão da via nigroestriatal pela aplicação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

Na tentativa de avaliação de possibilidades terapêuticas e de compreensão do processo de patogenicidade da DP, vários modelos experimentais para estudo da doença em animais foram desenvolvidos, e são divididos entre aqueles que utilizam neurotoxinas ou aqueles que utilizam a expressão de mutação genética (PENG and ANDERSEN, 2010). Uma característica comum a todos é a sua capacidade para produzir estresse oxidativo e causar morte celular neuronal (BOVÉ, 2012; ZHAO *et al.*, 2015).

Como apenas menos de 10% dos casos de PD são devidos a mutações genéticas, ao passo que a grande maioria dos casos de DP surge como esporádica, ou seja, de origem desconhecida, os modelos genéticos são menos utilizados, além de não serem seletivos na morte neurônios dopaminérgicos (DAWSON and DAWSON, 2010).

O modelo de aplicação de 6-OHDA apresenta a vantagem de precisão do seu efeito e facilidade de quantificação da anomalia motora em animais.

Embora a estrutura da 6-OHDA seja semelhante à da dopamina, facilitando seu acesso ao interior celular por receptação pelos neurônios DA, a presença de um grupo hidroxila adicional faz com que ela seja tóxica para os neurônios dopaminérgicos. A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, o que exige sua injeção direta no SNC. Assim, animais como, ratos, camundongos, gatos, cães e macacos são todos sensíveis à ação da 6-OHDA. Nestes, a neurotoxina 6-OHDA, quando injetada no estriado dorsal (núcleos caudado/putâmen, CPu), induz lenta e progressivamente a lesão parcial da via nigroestriatal de forma retrógrada durante um período que pode variar de três a várias semanas, dependendo da dose utilizada (TIEU, 2011).

Assim, o método de aplicação de 6-OHDA foi o eleito no presente trabalho, a fim de obter um perfil de lesão progressiva que mais se assemelha ao quadro da DP (SUN *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2013; BLESÁ *et al.*, 2015).

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensaios químicos para avaliação de atividade antioxidante *in vitro*

O presente estudo realizou a análise da atividade antioxidante *in vitro* de FORM em comparação com as vitaminas A e E, de forma isolada e combinada.

Dentre os métodos usados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, foram eleitos os métodos colorimétricos DPPH, ABTS e FRAP (NUR, NUSRAT and RAFIQUZZAMAN, 2012).

4.1.1 Concentração Inibitória (IC50)

Para análise, foi utilizada a concentração inibitória (IC50), quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre (DPPH, ABTS e FRAP) em 50% (IC50). Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação (CHEN *et al.*, 2011):

$$\%AA/EqVit C = \{[Abscontrole - (Absamostra - Absbranco)] \times 100\} / Abscontrole$$

Onde, %AA corresponde ao percentual de redução do radical livre relacionado ao equivalente (Eq) em vitamina C (Vit C) e em Trolox, tomadas como referência de ação antioxidante (VAN DEN BERG *et al.*, 1999); Abscontrole foi a absorbância inicial da solução do radical livre (controle negativo) e Absamostra foi a absorbância da substância reacional entre o radical livre e a vitamina C (controle positivo); e Absbranco resulta da absorbância da substância reacional entre o radical livre e o antioxidante em análise.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre (DPPH, FRAP e ABTS) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda correspondente ao radical DPPH=517 nm; ao FRAP=593 nm e ao ABTS=734 nm, utilizando-se como controle positivo a vitamina C e o Trolox (CHEN *et al.*, 2011).

4.1.2 Método DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante de substâncias, um dos métodos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração azul violáceo que absorve no comprimento de onda de 517 nm, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•). O DPPH• foi reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, variando a coloração de azul violáceo a azul claro, com consequente diminuição da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir da solução estoque de 3 mL, em diferentes concentrações, acrescentou-se 0,75 mL da solução de DPPH e aferiu-se as absorbâncias com tempo de 15 minutos de estabilização no escuro. A partir dos resultados de absorbância obtidos, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de DPPH• remanescente no meio reacional, após leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda 517 nm.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Assim, quanto maior foi o consumo de DPPH por uma amostra, menor foi a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (WOOTTON-BEARD, MORAN and RYAN, 2011).

4.1.3 Método ABTS

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, que apresenta cor azul esverdeado, com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS•+ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes

hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais. O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 mL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 12-16 horas. Em seguida, foi diluído 1 mL desta mistura em etanol P.A. até se obter uma absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$), num comprimento de onda de 734 nm. A solução foi preparada e utilizada no mesmo dia da análise (FALLEH *et al.*, 2011).

Desta forma, adicionou-se uma alíquota de 30 μ L de cada diluição para análise, em 3,0 mL do radical ABTS^{•+}, em ambiente escuro. Em seguida, homogeneizou-se e procedeu-se à leitura das absorbâncias após 6 minutos de repouso num comprimento de onda de 734 nm (THOO *et al.*, 2013).

4.1.4 Método FRAP

O método baseia-se numa reação redox, em que os antioxidantes atuam como redutores, e um oxidante facilmente reduzido (Fe^{3+}) é utilizado em excesso estequiométrico, resultando num complexo de ferro, com cor azul. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (WOOTTON-BEARD, MORAN and RYAN, 2011; ZHANG *et al.*, 2010).

O ensaio FRAP foi realizado por adição de 90 μ L de amostra em 2,7 mL de reagente FRAP e 270 μ L de água destilada; incubando-se durante 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância foi lida num comprimento de onda de 593 nm (WOOTTON, BARBA and RYAN, 2012).

4.1.5 Equipamento

Foi utilizado um espectrofotômetro digital da marca *Hach*, modelo 5000 UV-VIS.

4.1.6 Reagentes

Os reagentes na preparação do radical livre de DPPH, ABTS e FRAP e como também o trolox foram todos obtidos a partir de Sigma-Aldrich. As substâncias testadas foram: vitamina A, vitamina C, vitamina E, obtidas da Janssen-Cilag Farmacêutica (São Paulo, SP, Brasil) e a formononetina, obtida da Xi'an Olin Biological Technology CO., LTD (Xi'an, China) com 98% de pureza.

O etanol a 70% foi o solvente utilizado na preparação de diluições de concentrações diferentes, por ter a capacidade de dissolver os diferentes grupos de compostos antioxidantes, sem influenciar sua atividade antioxidante. Verificou-se que em soluções, o etanol (PA ou aquoso) foi o melhor solvente para preparar as amostras de flavonóides e compostos fenólicos (NUR *et al.*, 2012; BANGOURA, NSOR-ATINDANA and MING, 2013).

4.1.7 Preparação de Amostras

As soluções foram preparadas na faixa de 0,035-0,283 mg/mL, com os compostos isolados e combinados, preparados nas mesmas quatro concentrações: 0,035; 0,177; 0,236; 0,283 (em mg/mL), dissolvidos em etanol a 70% e os ensaios foram realizados em triplicata.

Assim, as soluções foram preparadas nas mesmas concentrações para análise comparativa com vitamina C e com trolox (KIM *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2012).

4.2 Ensaio biológico *in vivo*

As amostras deste estudo foram compostas por ratos Wistar ($250\text{g} \pm 30\text{g}$) adultos machos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C , em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas e água e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil) *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA/UNIT/SE), sob parecer consubstanciado nº 020912.

Foram usadas as seguintes drogas e reagentes: Anticorpo primário antiTH foi adquirido junto à Santa Cruz Biotechnology (Salvador, BA, Brasil) enquanto o kit de revelação com anticorpo secundário (anti *rabbit*, Vector Laboratories) foi obtido da Klonelife Brasil. A formononetina foi obtida da Xi'an Olin Biological Technology CO, LTD (Xi'an, China) com 98% de pureza.

4.2.1 Desenho Experimental

Os grupos experimentais foram definidos com distribuição de 5 ratos *Wistar* em cada grupo. Os grupos foram constituídos da seguinte forma: o primeiro grupo foi formado por animais que foram submetidos aplicação da toxina 6-OHDA por meio de cirurgia estereotáxica e que foram tratados com solução salina i.p; o segundo grupo foi formado por animais que foram submetidos a a microinjeção de solução salina no estriado dorsal e que foram tratados com solução salina; o terceiro grupo recebeu aplicação de 6-OHDA foi tratado com

formononetina na dose de 10 mg/kg, o quarto grupo também recebeu aplicação da 6-OHDA e foi tratado com formononetina na dose de 20 mg/kg, com volume de 2,5 mL injetados i.p. em todos os grupos.

O tratamento com formononetina foi realizado diariamente durante as duas semanas consecutivas a partir do dia da lesão por via i.p. Foram realizados testes comportamentais aos vinte e um (21) dias e eutanásia aos vinte e oito (28) dias após a lesão, para análises histológicas. Tais tempos foram escolhidos levando-se em conta o período de progressão da neurodegeneração e estabelecimento de morte neuronal passível de avaliação comportamental e histológica, conforme descrito por Khan *et al.* (2012).

Neste estudo, assim como citado em estudos anteriores, com modelo experimental para estudo da DP pela aplicação de 6-OHDA, o tempo necessário para a progressão da morte neuronal e observação de possíveis sintomas foi de 14 a 21 dias, (BLANDINI *et al.*, 2007; XIMENES *et al.*, 2015), para que fosse possível observar a diminuição da função motora, avaliada pelos parâmetros de exploração e elevação nos testes de comportamento (WANG *et al.*, 2011).

Desta forma, para este estudo, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica. Já no primeiro dia foi iniciado o tratamento e mantido durante todo o período do ensaio biológico. O teste comportamental de campo aberto, foi realizado após 21 dias de cirurgia e a eutanásia com 28 dias de tratamento. Seguindo recomendações da literatura, os animais do presente estudo foram submetidos aos procedimentos em períodos específicos, conforme tabela 2.

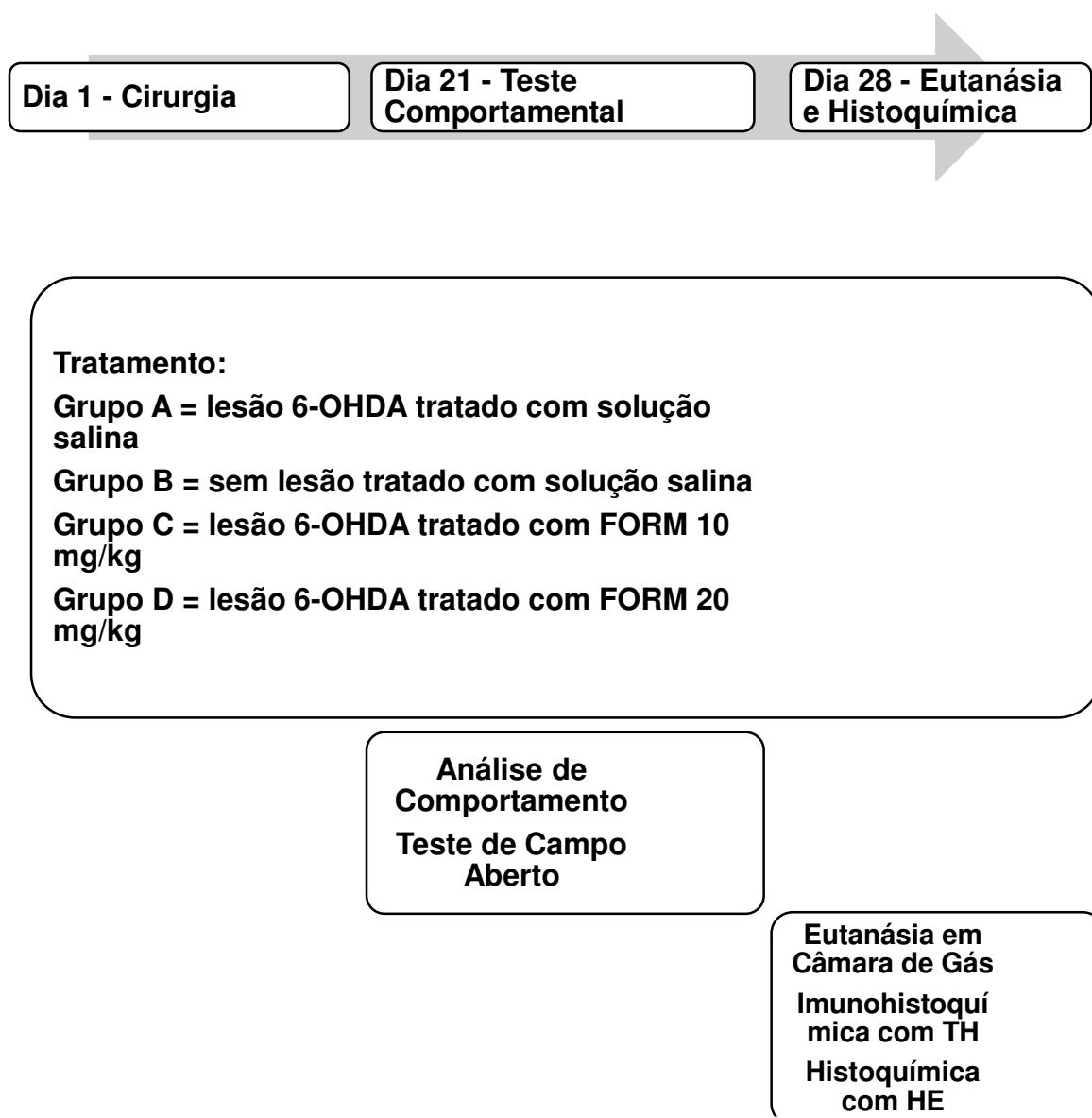


Tabela 2: Esquema representativo da linha do tempo de tratamentos e procedimentos ocorridos em cada período de tempo, em dias.

4.2.2 Lesão da via nigroestriatal causada pela aplicação intraestriatal da toxina 6-OHDA

A injeção intracerebral de 6-OHDA ou veículo (solução salina contendo ácido ascórbico a 0,02%) foi realizada por meio de cirurgia estereotáxica, (GOMES, RAISMAN-VOZARI and DEL BEL 2008; KAHN *et al.*, 2012).

Os animais foram anestesiados previamente com um mistura de ketamina e xilazina (100 e 14 mg/kg, respectivamente, i.p., 1 mL/kg). Após anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça, onde foi administrada injeção subcutânea local de 0,2 mL de lidocaína a 3% contendo epinefrina a 2%.

Os parâmetros utilizados (lado direito) para microinjeção de solução de 6-OHDA (10 µg em 2 µL) ou de salina contendo 0,02% de ácido ascórbico no estriado foram: -0,5 mm ântero posterior e -2,5 mm lateral ao Bregma e dorsoventral - 4,5 mm em relação à caixa craniana, através de coordenadas estereotáticas, conforme adaptação do estudo de KAHN *et al.*, (2012), utilizando uma cânula acoplada a micro seringa *Hamilton* (50 µL), com auxílio de bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) a uma velocidade de de 0,5 µL/min.

A cânula foi deixada no local por um período adicional de 2 min a fim de evitar refluxo das soluções. Ao final da cirurgia, a pele foi suturada, foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (*Forte Dodge Saúde Animal LTDA*, 0,2 mL) e os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60W até recuperação da anestesia.

4.2.3 Avaliação da função motora

Aos vinte em um (21) dias após cirurgia foi realizado o teste de campo aberto. O teste consiste na mensuração de comportamentos ao se colocar um animal em espaço novo aberto, sendo a fuga do mesmo evitada pelas paredes que o circundam. Este teste pode ser utilizado para avaliação da atividade motora e do estado emocional dos animais. Adicionalmente, permite prever a intensidade da lesão produzida pela 6-OHDA uma vez que os animais efetivamente lesionados iniciam a exploração preferencialmente para o lado

homolateral à lesão (WANG *et al.*, 2011). Os parâmetros avaliados foram: (1) a frequência dos comportamentos de exploração horizontal ou *crossing* - número de quadrantes percorridos pelo animal com as quatro patas; (2) elevações ou *rearing* - exploração vertical com a manutenção do animal apenas sobre as patas posteriores, os quadrantes de locomoção efetuada pelo animal; (3) se *ipsi* (ambulações para a direita) ou (4) *contralateral* (ambulações para a esquerda) à lesão, (5) tempo de latência para início do movimento e o (6) tempo de imobilidade.

Foi utilizada uma arena, que consistiu numa área quadrada de 72 cm de lado, com paredes revestidas por fórmica de cor branca de 49 cm de altura, subdividida em quadrantes de 100 cm² cada (HONGXING *et al.*, 2007; O'LEARY *et al.*, 2013).

Cada animal foi avaliado individualmente durante 5 minutos, sob filmagem para análise com maior precisão. Entre o teste de um animal e outro, o equipamento foi limpo com etanol a 20% para evitar a influência do cheiro do animal anterior.

4.2.4 Avaliação histológica

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os encéfalos foram retirados por dissecação e foram acondicionadas individualmente em coletores com solução de formol tamponado a 10% (formalina) com a devida identificação. O processamento histológico do material foi realizado sete (7) dias após coleta; o qual foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilóis, e incluído em parafina sob a forma de blocos.

Os blocos rígidos foram levados ao micrótomo, para fornecer os cortes de 5µm de espessura coletados em água aquecida e dispostos em lâminas previamente gelatinizadas. Foram obtidos cortes da região da substância negra compacta e do núcleo estriado, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). Para cada animal, foram obtidos, em média, 15 cortes encefálicos intercalados de cada região (do estriado e da substância negra), de modo a representar toda a extensão rostrocaudal das estruturas.

Após os cortes, as lâminas foram secas em estufa a 37°C antes da realização dos procedimentos histológicos e de imunohistoquímica. Assim, os cortes foram destinados à identificação na presença da enzima tirosina-hidroxilase (TH), para imunohistoquímica, e com a coloração de hematoxilina-eosina (HE), para avaliação morfológica e da resposta inflamatória.

As quantificações foram realizadas por meio de análise de imagens utilizando microscópio *Olympus CX31* acoplado à câmera fotográfica *Olympus*.

4.2.4.1 Reação Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é um método usado para o estudo de proteínas, mantendo-se seu contexto anatômico. Para tanto, foi utilizado anticorpo específico dirigido ao antígeno, a enzima TH, para verificação de morte neuronal dopaminérgica. Esta enzima participa da etapa limitante da síntese da dopamina e é utilizada como marcador de neurônios dopaminérgicos remanescentes (WU and JOHNSON, 2011).

Os cortes do mesencéfalo contendo a SNc foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 0,3% por 30 minutos, à recuperação antigênica realizada pela exposição a dois ciclos de 10 minutos em

forno de micro-ondas em potencia alta, ao bloqueio da marcação inespecífica pela incubação com soro albumino-bovino 2% durante duas horas e à incubação com anticorpo primário anti TH (feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology, 1:100 a 4°C durante 18 horas).

Para aumentar a visualização da ligação foi empregado o método de marcação indireta: enxágue das seções, incubação com anticorpo secundário anti coelho (1:500) e com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:150), ambos (Kit ABC, *Vectastain*, *Vector Laboratories*®) durante duas horas em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) na proporção de 10 mg de DAB para 20 ml de tampão e 3ul de H₂O₂ por 10 minutos. Ocorre uma reação de oxidação, formando um composto insolúvel, corado marrom e elétron denso que se deposita, marcando assim a localização do antígeno. Entre os procedimentos citados as seções foram lavadas em tampão fosfato (PBS) 0,1M. Todos os procedimentos foram realizados sob agitação.

Para quantificação do número de células na substância negra compacta as imagens foram capturadas das lâminas usando câmara *Olympus* C-7070, acoplada a microscópio *Olympus* CX31. O campo visualizado foi salvo. O número de células que apresentaram marcação positiva foi contado em toda a extensão da SNc do lado lesionado em cada corte obtido e os resultados foram apresentados como porcentagem de neurônios remanescentes em relação ao lado contralateral (intacto), a fim de diminuir a influência de variações individuais (MORRONI *et al.*, 2014; FINE *et al.*, 2014).

4.2.4.2 Avaliação estrutural e da resposta inflamatória

Para análise das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório no estriado, foram analisadas as secções histológicas do estriado coradas em HE, observando-se os critérios de intensidade, tipo do infiltrado inflamatório e hiperemia. A reação inflamatória foi determinada quanto à intensidade da reação e foram atribuídos escores de 1 a 3, de acordo com o seguinte padrão (XIMENES *et al.* 2015):

- 1 (grau agudo) – O infiltrado inflamatório/hiperemia pode ser observado em menos de 10% do tecido;
- 2 (grau moderado) – Presença de infiltrado/hiperemia em 10 a 50 % do tecido;
- 3 (grau severo) – O infiltrado inflamatório/hiperemia ocorre em mais de 50% do tecido.

O tecido foi analisado também com relação à presença de outras alterações histopatológicas (LI *et al.*, 2013). Foram observadas diferenças entre os grupos quanto ao aspecto quantitativo e morfológico dos neurônios remanescentes, em relação à presença de aglomerados de células da micróglia e com relação à uniformidade na distribuição de células.

Para que a análise histológica fosse realizada às cegas quanto ao grupo experimental, os códigos de identificação de cada lâmina foram cobertos por outro experimentador antes do início da análise e revelados após o término.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do ensaio químico foram apresentados como valor de IC50 com intervalo de confiança de 95% (IC 95%), obtido por meio de regressão não-linear. Foi realizada análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguida do pós-teste de *Tukey*.

Para avaliação da atividade neuroprotetora (teste de comportamento e avaliação imunohistoquímica), os dados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM) e foi realizada a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguida do pós-teste de *Tukey*. Para análise do padrão da resposta inflamatória, as médias entre os grupos foram comparadas por meio do teste de *Kruskal-Wallis* com extensão de *Dunn*.

As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Foi utilizado o programa *GRAPHPAD Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA)*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados dos ensaios *in vitro*

Os compostos foram preparados nas mesmas concentrações para análise comparativa com vitamina C e com trolox, sendo estes utilizados como controles positivos (NUR *et al.*, 2012). Quanto ao comprimento de onda, foi utilizado para a análise em cada método o recomendado pela literatura. Apenas para o método de DPPH, o comprimento de onda a ser usado foi confirmado por varredura em espectrômetro, devido a diferentes comprimentos de onda referidos na literatura; 515nm, 516nm e 517nm (KIM *et al.*, 2002; NUR *et al.*, 2012; CAVAR *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2013).

Assim, após varredura, foram observados dois picos de ondas, conforme figura 2. A primeira onda correspondeu à absorbância do solvente, etanol a 70%, e o segundo correspondeu ao comprimento da maior absorbância do radical livre. A leitura confirmou o comprimento de onda a 517nm por digitalização para a DPPH e absorção de 2.421, utilizado como controle negativo.

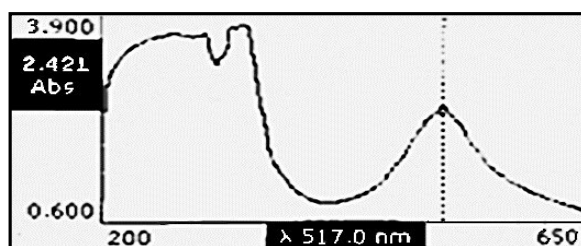


Figura 2: Determinação do comprimento de onda do radical livre DPPH. Verificação do comprimento de onda em 517 nm e absorbância de 2,421 do radical livre DPPH no Espectrofotômetro *Hach* 5000 UV-VIS.

Os resultados obtidos experimentalmente para os compostos isolados e para as combinações destes foram comparados. As diferenças significativas resultantes dessas comparações foram estabelecidas como aditivas ou não (MILOS and MAKOTA, 2012; PAN, ROHAN and TIKEKARB, 2013).

As IC₅₀ através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP permitiram a verificação da atividade antioxidante (WOOTTON, BARBA and RYAN, 2012; CAVAR, 2012). Todos os valores de IC₅₀ encontraram-se abaixo de 10 µM. Em conformidade com estudos anteriores, sugere-se que todos os compostos testados exibiram atividade antioxidante (LI *et al.*, 2014).

No teste DPPH, os maiores valores de IC₅₀ foram encontrados para a vitamina E, o que sugere menor ação antioxidante em relação às demais substâncias testadas de forma isolada ou combinada (todos os valores de $p <$

0,001). A FORM mostrou resultados semelhantes aos da vitamina A ($p > 0,05$). Em adição, a combinação de FORM com a vitamina A promoveu diminuição significativa dos valores de IC₅₀ em comparação a estas substâncias testadas de forma isolada (ambos os valores de $p < 0,001$). Já a combinação de FORM com a vitamina E promoveu aumento ($p < 0,001$) da ação antioxidante apenas em relação à vitamina E isolada (Figura 3, $F_{4-49} = 52,69$, $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

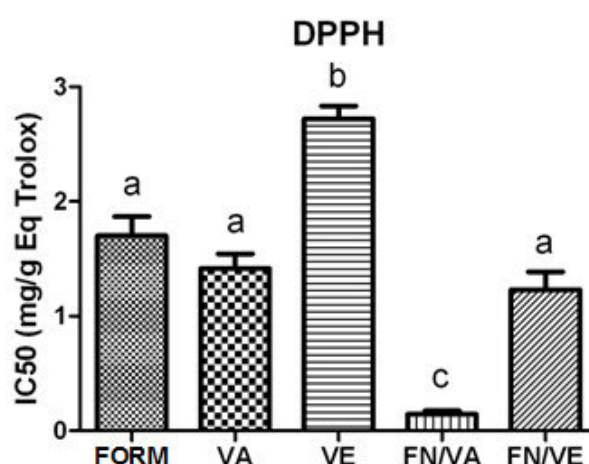


Figura 3: Resultados do teste DPPH. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos. FORM: formononetina; VA: vitamina A; VE: vitamina E; Eq Trolox: equivalente de Trolox ($p > 0,05$).

No teste ABTS os valores de IC₅₀ da FORM foram semelhantes aos das vitaminas A e E e este perfil não foi modificado pela combinação de FORM com a vitamina E ($p > 0,05$). Por outro lado, a combinação de FORM com a vitamina A promoveu diminuição significativa dos valores de IC₅₀ em comparação a todas as outras substâncias testadas ($p < 0,001$ em relação à FORM, à vitamina A e à vitamina E, $p < 0,01$ em relação à combinação de FORM com vitamina E) isoladas ou combinadas (Figura 4, $F_{4-49} = 12,07$, $p < 0,0001$,

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey). O método ABTS apresenta vantagem em relação aos outros, por poder ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (FROZZA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2010).

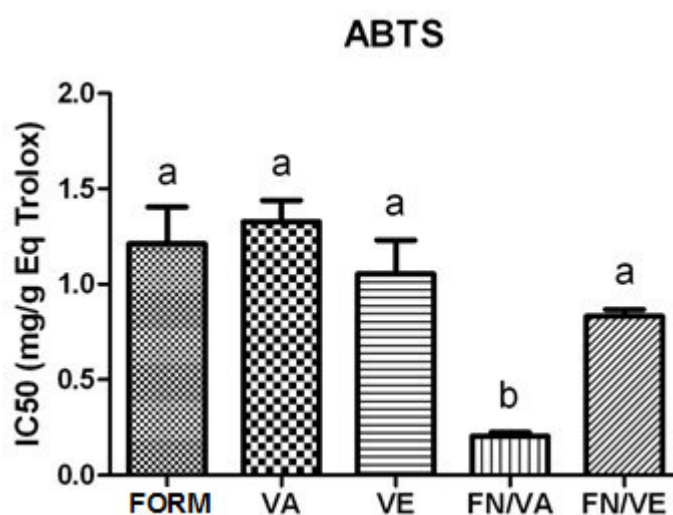


Figura 4: Resultados do teste ABTS. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos. FORM: formononetina; VA: vitamina A; VE: vitamina E; Eq Trolox: equivalente de Trolox ($p > 0,05$).

No teste FRAP os valores de IC50 da FORM foram semelhantes aos das vitaminas A e E ($p > 0,05$). A combinação de FORM com ambas as vitaminas resultou em valores significativamente menores (valores de $p < 0,001$) quando comparados às substâncias testadas de forma isolada (Figura 5, $F_{4-49} = 103,9$, $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

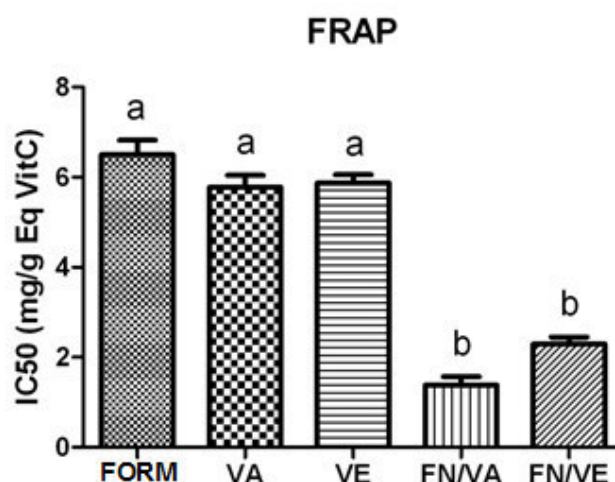


Figura 5: Resultados do teste FRAP. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos. FORM: formononetina; VA: vitamina A; VE: vitamina E; Eq VitC: equivalente de vitamina C ($p > 0,05$).

Além disso, a combinação de FORM e vitamina A promoveu efeito aditivo, indicativo de atividade antioxidante maior em conjunto, do que a ação das mesmas isoladas em todos os métodos aplicados.

Considerando o papel do estresse oxidativo na DP e o conhecido efeito neuroprotetor da vitamina A e da FORM em estudos pré-clínicos para a DP (YIN *et al.*, 2012; ULUSOY *et al.*, 2011; ONO *et al.*, 2007), suscita-se a possibilidade de realização de outros estudos com a utilização desta combinação para fins terapêuticos no tratamento da DP.

Já a combinação de FORM com a vitamina E promoveu efeito aditivo no método FRAP, que mede a capacidade de redução dos íons de ferro. Nota-se outro aspecto pertinente à fisiopatologia da DP, onde aumento de ferro nigral exacerba os níveis de estresse oxidativo, que promove apoptose através da ativação de caspases, conforme estudo de WAKADE and CHONG, (2014).

Outros autores verificaram que a suplementação vitamínica com a vitamina E promoveu efeito neuroprotetor contra a peroxidação lipídica de axônios e de neurônios piramidais cerebelares em modelos animais e reduziu a progressão da degeneração neuronal em pacientes com DP, possivelmente pelas características lipofílicas da vitamina E e seus benefícios sobre a mielinização neuronal (MAHYAR, SUDEEP and ALI, 2005; ULATOWSKI *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2015).

Também tem sido descrita a interação da vitamina E com outros antioxidantes, em especial com os flavonoides, que favorecem o processo de recuperação em reações de oxirredução da vitamina E nos tecidos biológicos e melhor utilização desta nos mecanismos antioxidantes (ARIFFIN *et al.*, 2011; THOO *et al.*, 2013).

Estudo anterior demonstrou que as vitaminas A, E e C quando combinadas reduziram os valores de IC50, dado indicativo de potencialização da ação antioxidante das mesmas. Assim, o efeito da combinação destas vitaminas com a FORM a, verificado no presente trabalho, foi quantitativamente similar ao encontrado para a combinação das vitaminas entre si, nos ensaios *in vitro* da literatura (LIU *et al.*, 2008).

Tais dados fortalecem o pressuposto de potencialização das propriedades antioxidantes dos compostos quando combinados e a possibilidade de ampliar a regeneração das vitaminas nas reações de oxirredução em tecidos biológicos com a presença da isoflavona FORM (ARIFFIN *et al.*, 2011, MORETTI *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estudos sobre o uso da vitamina C em associação com as vitaminas A e E têm demonstrado efeito sinérgico destas e redução da depressão, possivelmente por ter sido observado redução dos níveis de catalase, glutathione e superóxido dismutase em áreas frontais corticais e no hipocampo, e redução da excitotoxicidade (SATO, SAITO and KATSUKI, 1993; BANO and PARIHAR, 1997; KUMAR, KUHAD and CHOPRA, 2011; SANACORA, TRECCANI and POPOLI, 2012).

Assim, a interação entre vitaminas e formononetina observada no presente estudo, pode ser importante para o efeito biológico integrado, uma vez que os carotenóides podem ser regenerados dos seus radicais catiônicos, e que a regeneração das membranas biológicas pode ser mais eficiente na presença de flavonóides (PETERSON and DWYER, 1998; HAN, ZHANG and SKIBSTED, 2012).

5.2 Resultados dos ensaios *in vivo*

No presente estudo, a aplicação de 6-OHDA promoveu diminuição no número médio de explorações (*crossing*) em relação ao grupo que recebeu salina ($p < 0,05$) e este efeito foi modificado pelo tratamento com a formonoentina na dose de 20 mg/Kg ($p < 0,001$).

Além disso, foi observada diferença entre as doses administradas ($p < 0,05$), sendo que o grupo tratado com FORM a 10 mg/Kg mostrou valores similares ao grupo lesionado ($p > 0,05$), enquanto que os valores do grupo tratado com a dose de 20 mg/Kg foram semelhantes aos do grupo não lesionado [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-27} = 8,593$, $p = 0,0005$), figura 6 A].

Com relação ao número médio de elevações (*rearing*), a aplicação de 6-OHDA promoveu diminuição no número médio de explorações (*crossing*) em relação ao grupo que recebeu salina ($p < 0,05$) e este efeito foi modificado pelo tratamento com a FORM na dose de 20 mg/Kg ($p < 0,001$). O grupo tratado com FORM20 mostrou valores similares aos do grupo não lesionado, enquanto o grupo tratado com FORM10 não apresentou diferenças significativas em relação a nenhum outro grupo ($p > 0,05$) [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-26} = 8,243$, $p = 0,0007$), figura 6 B].

Foi observado aumento significativo do tempo de latência para início do movimento nos grupos lesionados tratados com veículo e com FORM a 10 mg/Kg em relação ao grupo não lesionado (ambos com $p < 0,01$). O tratamento com FORM na dose de 20 mg/Kg diminuiu o tempo de latência quando comparado aos grupos lesionados tratados com veículo e FORM a 10 mg/Kg (ambos com $p < 0,05$) e mostrou valores semelhantes ao grupo não lesionado ($p > 0,05$) [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-16} = 9,611$, $p = 0,0013$), figura 6 C].

O tempo de imobilidade durante o teste também foi maior nos grupos lesionados tratados com veículo e com FORM a 10 mg/Kg em relação ao grupo não lesionado ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). O tratamento com FORM na dose de 20 mg/Kg diminuiu o tempo de latência quando comparado aos grupos lesionados tratados com veículo e FORM a 10 mg/Kg ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e mostrou valores semelhantes ao grupo não lesionado ($p > 0,05$) [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-16} = 9,050$, $p = 0,0017$), figura 6 D].

A direção preferencial para realização de movimentos no sentido homolateral à lesão, neste caso para a direita (ambulações para a direita), fornece um indicativo da efetividade da lesão, pois os animais lesionados tendem a mover-se em círculo neste sentido. Isso decorre da depleção dopaminérgica após lesão unilateral e maior movimentação dos membros do lado intacto (WILLARD, BOUCHARD and GITTIS, 2015).

O aumento nas ambulações para a direita foi observado apenas no grupo lesionado tratado com veículo ($p < 0,01$ comparado ao grupo não lesionado; $p < 0,001$ comparado ao grupo lesionado tratado com FORM a 10 mg/Kg; $p < 0,01$ e comparado ao grupo tratado com FORM a 20 mg/Kg) [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-33} = 12,31$, $p < 0,0001$), figura 6 E].

Em contrapartida, a movimentação para o lado contralateral à lesão (ambulações para a esquerda) que requer a integridade das vias de controle do lado lesionado – os núcleos da base fazem parte de vias extrapiramidais – as ambulações foram reduzidas nos grupos lesionados tratados com veículo ($p < 0,001$) e FORM a 10 mg/Kg ($p < 0,001$) quando comparadas ao grupo não lesionado. No grupo tratado com FORM a 20 mg/kg, de forma similar ao grupo não lesionado, estes resultados mostraram-se aumentados em relação ao grupo tratado com veículo ($p > 0,05$) e tratado com FORM a 10 mg/Kg ($p > 0,01$) [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-33} = 12,31$, $p < 0,0001$), figura 6 F].

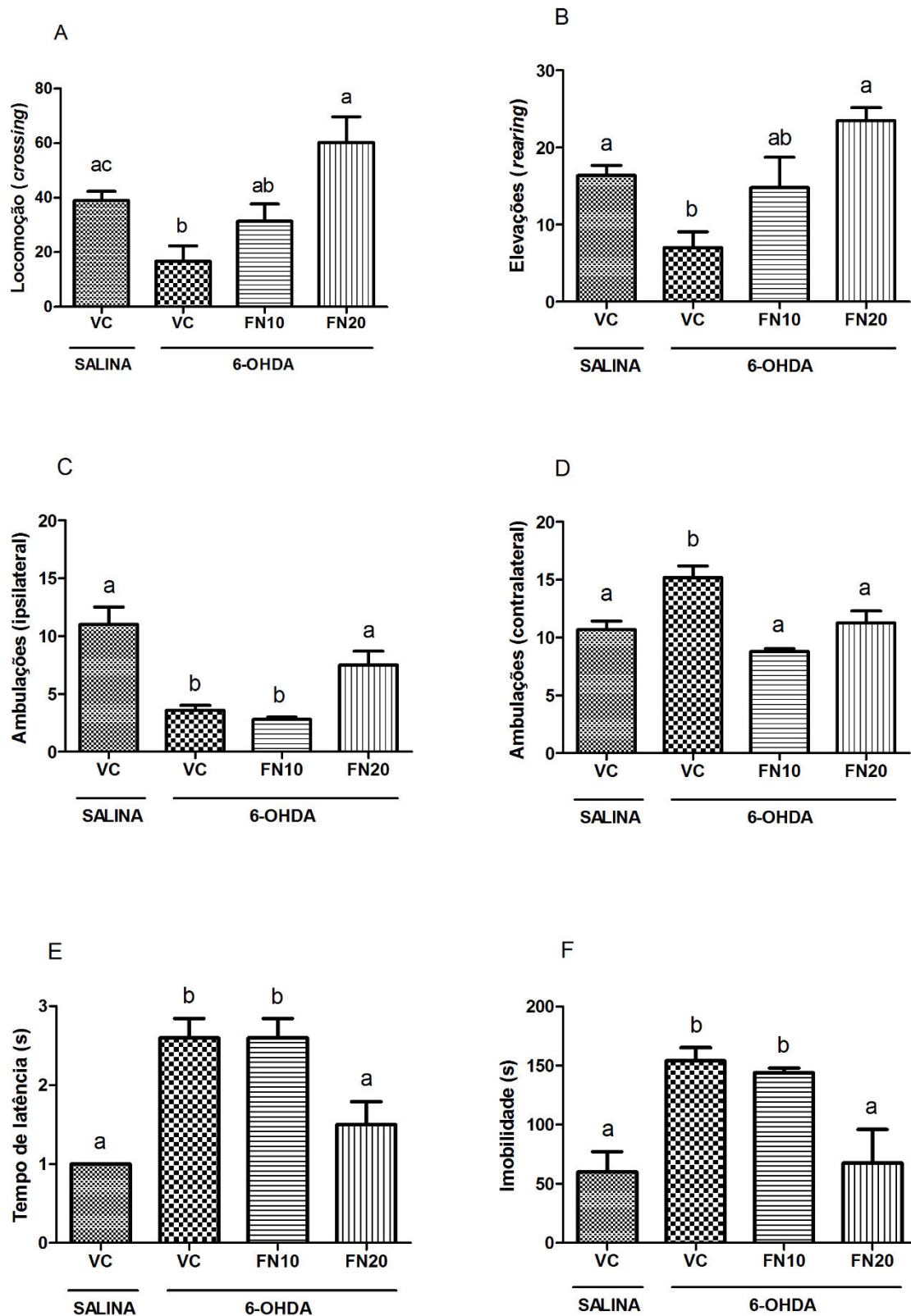


Figura 6: Resultados do teste de campo aberto. Teste de campo aberto realizado aos 21 dias após cirurgia estereotáxica. As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA de uma via e teste de Tukey, $p > 0,05$). VC: veículo; FN10: Formononetina a 10 mg/Kg; FN 20: Formononetina a 10 mg/Kg; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

A aplicação de 6-OHDA promoveu, portanto, os déficits motores que comumente advém de lesão da via nigroestriatal em ratos e que se assemelham a sintomas parkinsonianos. Estes resultados apontam para a efetividade da toxina em induzir morte de neurônios dopaminérgicos, e consequente perda da inervação estriatal, pois os sintomas motores são observados somente quando há perda da ordem de pelo menos 60% dos neurônios na substância negra compacta (SNc) (WINKLER *et al.*, 2002). Também são encontradas dificuldades na iniciação dos movimentos (tempo de latência) e lentidão na execução dos movimentos (imobilidade). Estes déficits estão relacionados aos sintomas observados na DP, como a bradicinesia e a acinesia, respectivamente (DEXTER and JENNER, 2013).

Quando a lesão foi acompanhada de tratamento com a FORM a 20 mg/Kg o efeito tóxico foi modificado em todos os parâmetros observados. Assim, a FORM a a 20 mg/Kg trouxe os valores médios dos escores para os níveis de normalidade em todos os testes, enquanto a menor dose, de 10 mg/Kg, provavelmente não tenha sido suficiente para alcançar o mesmo resultado.

Tal recuperação funcional apresenta coerência com os achados histológicos (todos os grupos com diferenças entre si e valores de $p < 0,001$). Observou-se diminuição da imunomarcação para TH na SNc do grupo lesionado, aos 28 dias após a cirurgia (22% em média de neurônios remanescentes), enquanto que o tratamento com FORM a 20 mg/Kg promoveu aumento significativo do número médio de neurônios remanescentes (79%).

Embora a menor dose de FORM na dose de 10 mg/kg também tenha mostrado efeito significativo quando ao número de neurônios dopaminérgicos remanescentes (51%) quando comparado ao grupo lesionado tratado com

veículo, esta porcentagem ainda se enquadra na faixa de perda que é considerada severa, o que pode explicar a ausência de efeito consistente na recuperação motora. Salienta-se ainda a diferença significativa observada com relação às doses de FORM testadas [ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($F_{3-20} = 165,5$, $p < 0,0001$), figura 7].

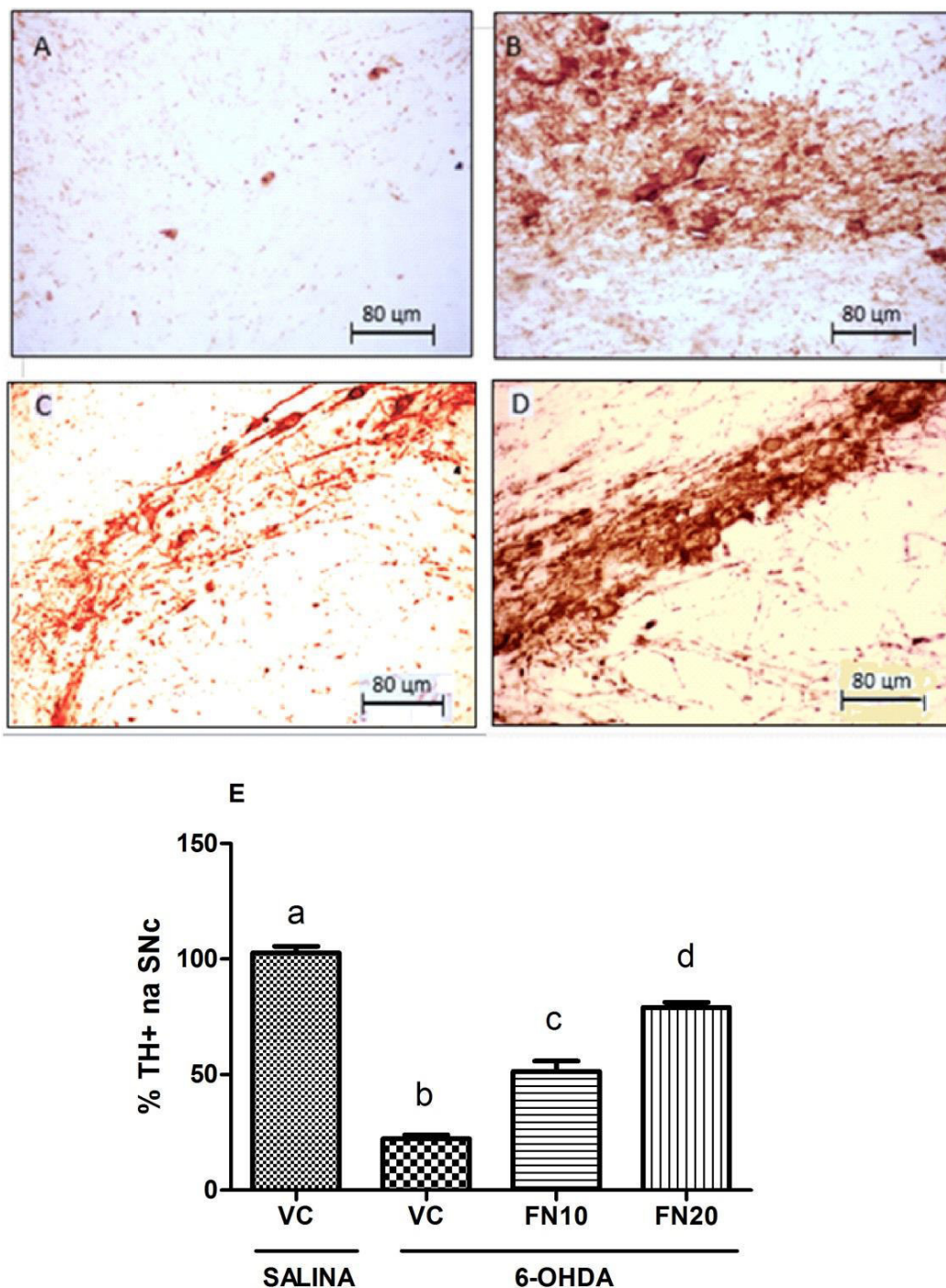


Figura 7: Análise da substância negra compacta. Fotomicrografias da substância negra compacta e resultados da quantificação de neurônios marcados para a enzima tirosina-hidroxilase. No painel superior, fotomicrografias da substância negra compacta (SNc) de animais dos grupos 6-OHDA tratado com veículo (A), não lesionado (B) e lesionado tratado com Formononetina nas doses de 10 (C) e 20 mg/Kg (D). Aumento de 400X. No painel inferior (E), resultados da quantificação de neurônios positivamente marcados para a enzima tirosina-hidroxilase (TH), expressos em porcentagem. As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA de uma via e teste de Tukey, $p >$

0,05). VC: veículo; FN10: Formononetina a 10 mg/Kg; FN 20: Formononetina a 20 mg/Kg; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

Finalmente, considerando que a aplicação da neurotoxina foi realizada no estriado dorsal, foi realizada avaliação das possíveis modificações histopatológicas nesta região que recebe a inervação de neurônios dopaminérgicos. A 6-OHDA é injetada no estriado de forma a ser transportada retrogradamente até a SNc. Dessa forma, a morte neuronal dopaminérgica ocorre progressivamente ao longo do tempo, de maneira semelhante ao processo neurodegenerativo que ocorre na DP (KIRIK *et al.*, 2002).

Quanto à análise histopatológica através da coloração hematoxilina-eosina (HE), foi possível visualizar as diferenças entre os grupos quanto ao aspecto quantitativo e morfológico dos neurônios remanescentes, em relação à presença de aglomerados de células da micróglia, com relação à uniformidade na distribuição de células e quanto à presença de infiltrados inflamatórios.

Observou-se no grupo lesionado tratado com veículo a presença de grande quantidade de deformações nos neurônios, apresentando-se dismorfos, menores, alongados e aglomerações de células da micróglia, indicativo de neuroinflamação; no grupo não lesionado pôde-se notar a preservação do tecido nervoso com parâmetros normais; no lesionado tratado com FORM a 10 mg/kg houve preservação de neurônios, menos intensidade de aglomerados microgliais e no grupo lesionado tratado com FORM a 20 mg/kg foi notada maior preservação de neurônios e redução na intensidade de aglomerados microgliais, em comparação com o grupo lesionado tratado com veículo (figura 8 A-D).

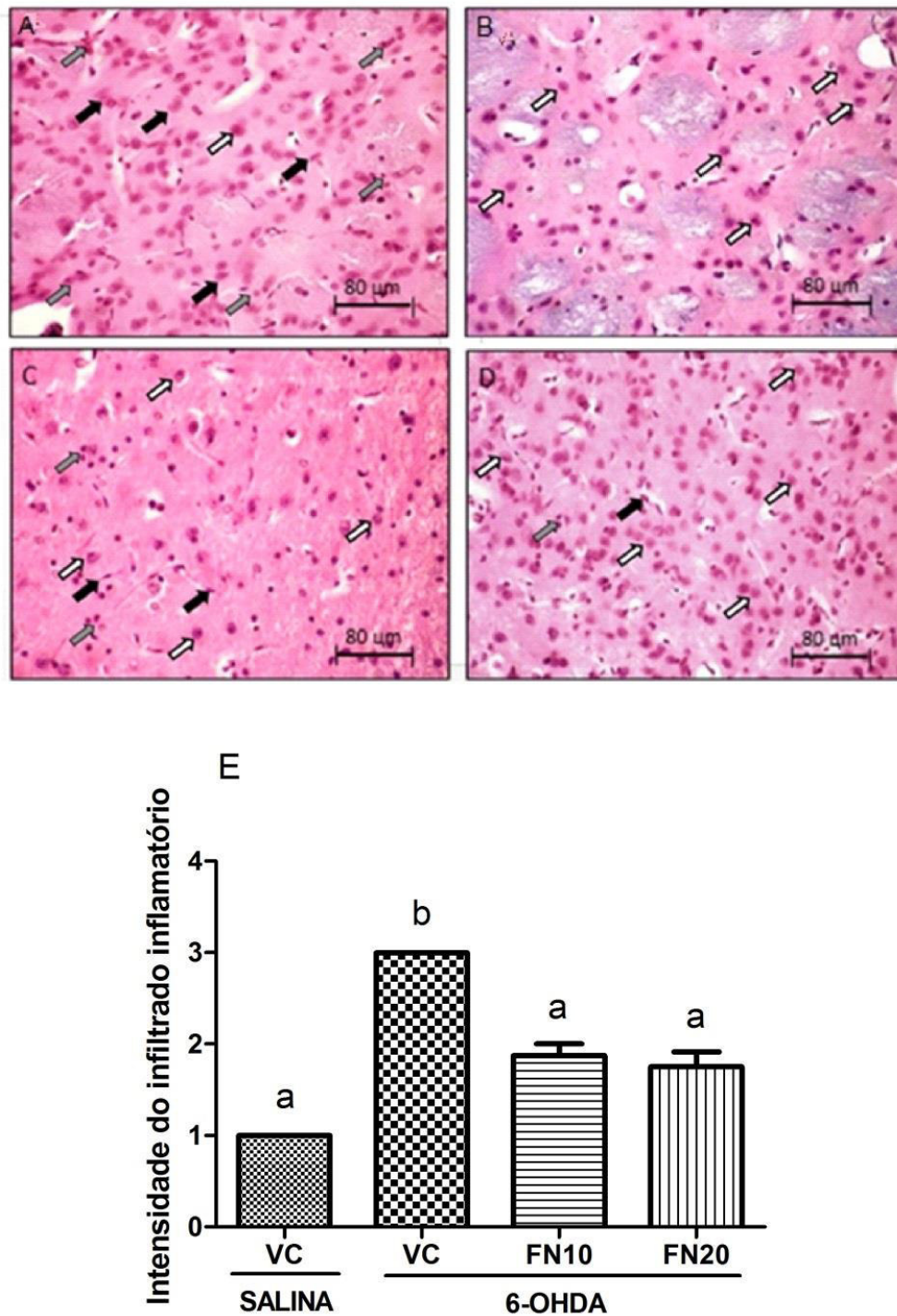


Figura 8: Análise do Estriado. Fotomicrografias do estriado e resultados da intensidade do infiltrado inflamatório com coloração hematoxilina-eosina. Secções do estriado (CPu) com coloração HE em aumento de 400 vezes (80 μm). Em A: grupo 6-OHDA tratado com veículo; B: Grupo controle, não lesionado tratado com veículo; C: grupo lesionado

com 6-OHDA e tratado com FORM a 10mg/Kg; D: grupo lesionado com 6-OHDA e tratado com FORM a 20mg/Kg. Seta Branca: neurônio normal; Seta Preta: neurônio dismorfo e Seta Cinza: infiltrado microglial; E: resultados da análise semiquantitativa dos escores de resposta inflamatória. As colunas representam as médias e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA de uma via e teste de Tukey, $p > 0,05$). VC: veículo; FN10: Formononetina a 10 mg/Kg; FN 20: Formononetina a 20 mg/Kg; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

Quanto à análise semiquantitativa da resposta inflamatória, verificou-se que em animais tratados com veículo após lesão induzida por 6OHDA, o escore apresentado foi 3, que representa grau severo, ou seja, mais de 50% de infiltrado inflamatório. Já o grupo sem lesão e tratado com veículo, apresentou grau agudo de inflamação, representado por menos de 10% de infiltração microglial no tecido.

Quanto aos grupos lesionados e tratados com FORM (10 e 20mg/Kg), observou-se grau moderado de inflamação com escore de 2 para ambos, representando 10 a 50% de infiltrado, conforme se observa na figura 8E. O aumento do grau de inflamação no grupo lesionado tratado com veículo foi significativo em relação a todos os demais grupos, não sendo observada diferença entre as doses de FORM testadas (Teste Kruskal-Wallis, com extensão de Dunn, $p < 0,0001$).

Assim, os dados são indicativos de ação anti-inflamatória da FORM sobre o tecido encefálico de roedores, evidenciada pela redução de infiltrado inflamatório microglial nos animais tratados, comparativamente ao grupo lesionado e tratado com veículo. Contudo, não houve diferença estatística entre o grupo tratado com FORM a 10 mg/Kg e 20 mg/Kg.

Dessa forma, tanto os achados comportamentais quando os dados histológicos apontam para um efeito neuroprotetor da FORM. O efeito anti-inflamatório deste composto pode ser associado com as suas propriedades antioxidantes, considerando-se interação de espécies reativas de oxigênio com mediadores inflamatórios (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015). Com efeito, estudos tem apontado que a FORM administrada sistemicamente (i.p. e intravenosa) atingiu o sistema nervoso e protegeu contra a isquemia (LIANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014) e contra lesão traumática cerebral (LI *et al.*, 2014).

A FORM aumentou as atividades glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, diminuiu os níveis de malonaldeído, ciclooxigenase 2 (COX-2), TNF- α e as concentrações de IL-6, ao mesmo tempo em que diminuiu a hidrocefalia e lesão neural após lesão (LI *et al.*, 2014).

Destaca-se que, a neuroinflamação mediada por células da glia configura um importante aspecto que contribui para a cascata de eventos que leva à morte celular observada na DP. Estes eventos envolvem alterações na produção de IL tipo 1 α e 1 β , TNF- α e NO pela microglia. Este último, formado pela enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS), pode reagir com superóxidos e formar peroxinitrito altamente reativo que promove a oxidação e nitração de proteínas (HIRSCH and HUNOT, 2009).

A FORM poderia também atuar em outros eventos característicos do sistema dopaminérgico em neurodegeneração, como a apoptose e excitotoxicidade glutamatérgica (DEXTER and JENNER, 2013), pois nos mesmos modelos descritos acima, a FORM agiu diminuindo a razão das proteínas cinases fosforiladas Bax (ativadora de apoptose) e Bcl-2 (inibidor da

ativação de apoptose) e aumentando a via de sinalização de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K/Akt) (LIANG *et al.*, 2014).

Em estudo *in vitro*, a FORM diminuiu a neurotoxicidade induzida pelo agonista glutamatérgico N-metil-D-asparato (NMDA), o número de células em apoptose foi atenuado, observando-se aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição dos níveis de Bax e caspase-3 (TIAN *et al.*, 2013).

Embora o glutamato seja essencial em processos plásticos cerebrais, como desenvolvimento e envelhecimento (BANERJEE *et al.*, 2008) e em processos de aprendizado e memória (SEGOVIA *et al.*, 2001), a excitotoxicidade mediada por este neurotransmissor está implicada em doenças como a DP (ROUSE *et al.*, 2000). A captação do glutamato extracelular é realizada por transportadores como GLAST e GLT-1 e pela enzima GS (DANBOLT, 2001). Contudo, a redução destes transportadores contribui para o dano neuronal (SCHALLIER *et al.*, 2011).

Os astrócitos são vulneráveis também ao estresse oxidativo. Neste sentido, enzimas responsáveis pela defesa antioxidante nos astrócitos, como superóxido dismutase, catalase e glutathione oxidada podem controlar a produção dos radicais livres quando em níveis normais, mas, quando em níveis baixos estão suscetíveis ao dano oxidativo (JIANG and CADENAS, 2014).

Assim, a manutenção dos astrócitos tem um papel importante na preservação da plasticidade sináptica e como mecanismo defensivo para células expostas à oxidação e à inflamação (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2014). Desta forma, estes eventos podem ser bloqueados por agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, possivelmente ações que podem ser desempenhadas pela FORM.

A FORM pode atuar de maneira protetora, portanto, em mais de um aspecto da cascata de eventos que contribuem para o surgimento e progressão da DP. Esta multiplicidade de ações da FORM poderia explicar porque, no presente estudo, não houve diferença significativa entre as doses de FORM quanto à resposta inflamatória, mas apenas a maior dose mostrou efetiva proteção nos parâmetros gerais comportamentais e na expressão imunohistoquímica para TH.

Em suma, os achados do presente trabalho fornecem evidências de que a FORM tem efeito neuroprotetor sobre a morte neuronal dopaminérgica experimentalmente induzida e que este efeito parece estar associado às suas características antioxidantes e anti-inflamatória.

6 CONCLUSÕES

Os achados do presente trabalho fornecem evidências de que a FORM apresentou atividade antioxidante *in vitro* comparada às vitaminas A e E, observando-se ação aditiva com as vitaminas testadas, quando combinadas. Já nos testes *in vivo*, foi verificada atividade neuroprotetora da FORM em modelo experimental da DP, sendo dados sugestivos que a FORM, como potente antioxidante, pode promover ação anti-inflamatória mediada por células da neuróglia, evidenciada pela preservação de neurônios e redução de infiltrado inflamatório microglial nos animais tratados.

Embora estudos adicionais sejam necessários para melhor elucidar os mecanismos de ação da FORM no sistema nervoso, suscita-se a possibilidade de utilização desta isoflavona como um candidato a fármaco para o tratamento da DP. Adicionalmente, sugere-se que a FORM possa ser utilizada como complemento às composições vitamínicas, dado que ela aumenta sua ação antioxidante, característica esta favorável ao combate de doenças crônicas e degenerativas.

Desta forma, a viabilidade de utilização da FORM a se faz tanto no aspecto fisiológico, em relação à biodisponibilidade farmacológica e atividades biológicas, quanto em termos de volume para escala produtiva, pela facilidade de obtenção em forrageiras como o trevo dos prados.

Desta forma, sugere-se o prosseguimento em estudos com a FORM, com vistas a futuras aplicações em dietas, na profilaxia e terapêutica de patologias associadas à inflamação e à neurodegeneração por ação dos radicais livres.

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- AGRAWAL S, GULLAIYA S, DUBEY V, SINGH V, KUMAR A, NAGAR A, AND TIWARI P. **Neurodegenerative shielding by curcumin and its derivatives on brain lesions induced by 6-OHDA model of Parkinson's disease in albino wistar rats.** Cardiovascular Psychiatry and Neurology Article ID 942981, 1-8. 2012.
- AL SS, SANCHEZMG, BOURQUEM, MORISSETTE M, DLUZEN D, DI PAOLO T. **Estrogen receptors and signalling pathways: implications for neuroprotective effects of sex steroids in Parkinson's disease.** J Neuroendocrinol; 24:48–61 2012.
- ALMEIDA IM, RODRIGUES F, SARMENTO B, ALVES RC, OLIVEIRA MB. **Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells.** Food Funct. 11;6(3):938-46. 2015.
- AMES B. N. **Micronutrients prevent cancer and delay aging.** Toxicology Letters;103, 5–18. 1998.
- ANDERSEN C, KOTOWSKA D, TORTZEN CG, KRISTIANSEN K, NIELSEN J, PETERSEN RK. **2-(2-Bromophenyl)-formononetin and 2-heptyl-formononetin are PPAR γ partial agonists and reduce lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.** Bioorg Med Chem. Nov 1; 22 (21):6105-11. 2014.
- ARAS AB, GUVEN M, AKMAN T, OZKAN A, SEN HM, DUZ U, KALKAN Y, SILAN C, COSAR M. **Neuroprotective effects of daidzein on focal cerebral ischemia injury in rats.** Neural Regen Res. 10(1):146-52, 2015.
- ARIFFIN, F., HEONG CHEW, S., BHUPINDER, K., KARIM, A. A., & HUDA, N. **Antioxidant capacity and phenolic composition of fermented Centella asiatica herbal teas.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(15), 2731–2739, 2011.
- ATKIN M. A., GASPER A., ULLEGADDI R., AND POWERS H. J. **Oxidative Susceptibility of Unfractionated Serum or Plasma: Response to Antioxidants *in Vitro* and to Antioxidant Supplementation.** Clinical Chemistry 51 (11), 2138–2144. 2005.
- AUYEUNG KK, LAW PC, KO JK. **Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft.** Oncol Rep; 28(6):2188-94. 2012.
- AZEVEDO, M.I., PEREIRA, A.F., NOGUEIRA, R.B., ROLIM, F.E., BRITO, G.A., WONG, D.V., LIMA-JUNIOR, R.C., DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R., VALE, M.L., **The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy.** Molecular Pain. 9, 53. 2013.
- BANERJEE R, VITVITSKY V, GARG S K. **The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission.** Trends Biochem Sci. 33, 413-419, 2008.
- BANGOURA M. L. NSOR-ATINDANA J; MING Z.H. **Solvent optimization extraction of antioxidants from foxtail millet species insoluble fibers end their free radical scavenging properties.** Food Chemistry 141, 736-744. 2013.
- BANO S, PARIHAR MS. **Reduction of lipid peroxidation in different brain regions by a combination of α -tocopherol and ascorbic acid.** Journal of Neural Transmission; 104: 1277-86. 1997.
- BAR-AMA O, AMIT T, KUPERSHMIDT L, ALUF Y, MECHLOVICH D, KABHA H, DANOVITCH L, ZURAWSKI V R, MOUSSA B.H., YODIM, WEINRE O. **Neuroprotective and neurorestorative activities of a novel iron chelator-brain selective monoamine oxidase-A/moanamine oxidase-B inhibitor in animal models of Parkinson's disease and aging** Neurobiology of Aging 36 1529-1542. 2015.
- BASTIDE M F., MEISSNER W G., PICCONI B, FASANO S, FERNAGUT P, FEYDER M, FRANCARDO V, ALCACER C, DING Y, BRAMBILLA R, FISONE G, STOESSL J, BOURDENX M, ENGELN M, NAVAILLES S, DEURWAERDERE P, KO W K, SIMOLA N, MORELLI M, GROG L, RODRIGUEZ M, GUREVICH EUGENIA V, QUIK M, MORARI M, MELLONE M, GARDONI F, TRONCI E, GUEHL D, TISON F, CROSSMAN A R, KANG UN J, STEECE-COLLIER K, FOX S, CARTA M, CENCI M. A, BEZARD E. **Athophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease.** Prog. Neurobiol. 1383 ;1-73. 2015.
- BEDIN, S.; FERRAZ, A. C. **Organização funcional dos circuitos dos núcleos da base afetados na doença de Parkinson e na discinesia induzida pela levodopa.** Saúde em Revista, v. 5, n. 9, p. 77-88. 2003.
- BELLAVER B, SOUZA D G, SOUZA D O , QUINCOZES-SANTOS A. **Resveratrol increases antioxidante defenses and deceases proinflammatory cytokines in hippocampal**

- astrocyte cultures from newborn, adult and aged wistar rats.** *Toxicology in vitro.* 28, 479-484, 2014.
- BIALESOVA L, NOVOTNA A, MACEJOVA D, BRTKO J, DVORAK Z. **Agonistic effect of selected isoflavones on arylhydrocarbon receptor in a novel AZ-AhR transgenic gene reporter human cell line.** *Gen Physiol Biophys.* 30. 2015.
- BLANDINI F, LEVANDIS G, BAZZINI E, NAPPI G, AND ARMENTE M. **Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model.** *European Journal of Neuroscience,* Vol. 25, pp. 397–405, 2007.
- BLESA J, TRIGO-DAMAS I, QUIROGA-VARELA A and JACKSON-LEWIS V R. **Oxidative stress and Parkinson's disease.** *Frontiers in Neuroanatomy.* Vol 9; Article 91, 1-9. 2015.
- BOVÉ J. and PERIER C. **Neurotoxin-based models of parkinson's disease.** *Neuroscience* 211 51–76. 2012.
- BRANN D, RAZ L, WANG R, VADLAMUDI R, ZHANG Q. **Estrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia.** *J Neuroendocrinol;* 24:34–47. 2012.
- BURGUILLOS M A, DEIERBORG T, KAVANAGH E, PERSSON A, HAJJI N, GARCIA-QUINTANILLA A, CANO J, BRUNDIN P, ENGLUND E, VENERO J L, JOSEPH B. **Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity.** *Nature* 472, 319–324, 2011.
- BURGUILLOS M A, SVENSSON M, SCHULTE T, BOZA-SERRANO A, GARCIA-QUINTANILLA A, KAVANAGH E, SANTIAGO M, VICECONTE N, OLIVA-MARTIN M J, OSMAN AM, SALOMONSSON E, AMAR L, PERSSON A, BLOMGREN K, ACHOUR A, ENGLUND E, LEFFLER H, VENERO J L, JOSEPH B, AND DEIERBORG T. **Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation.** *Cell Reports.* S2211-1247(15)00140-0. 2015.
- CAÍDO, S.C., CHANG, Y.S., WANG, J.P., CHEN, S.C., KUO, S.C., **Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*.** *Planta Medica.* 64, 153-518. 2011.
- CAVAILLON J.M., em **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, 2ª Edição, Vol. 8Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp 431-460. 2005.
- CAVAR S., KOVAC F., MAKSIMOVIC M. **Evaluation of the antioxidant activity of a series of 4-methylcoumarins using different testing methods** *Food Chemistry* 133, 930–937. 2012.
- CHEN CAI-YUN, YUAN-GANG Z., YU-JIE F., MENG L., CHUN-JIAN Z., WEI W., BAO-SHAN Z., JI L., EFFERTHC T. **The residues were dissolved in a specified amount of deionized water to obtain the sample solution, which was condensed or further diluted by deionized water to concentration ranges of 0.29–0.75 mg/mL for calycosin and 0.13–0.37 mg/mL for formononetin, respectively.** *Biochemical Engineering Journal* 56, 84– 93. 2011.
- CHEN C, YUAN-GANG ZU, YU-JIE FU, MENG LUO, CHUN-JIAN ZHAO, WEI WANG, BAO-SHAN ZHAO, JI LI, EFFERTHC T. **Preparation and antioxidant activity of Radix Astragali residues extracts rich in calycosin and formononetin** *Biochemical Engineering Journal* 56 84– 93. 2008.
- CHEN J, ZHANG X, WANG Y, YE Y, HUANG Z. **Formononetin promotes proliferation that involves a feedback loop of microRNA-375 and estrogen receptor alpha in estrogen receptor-positive cells.** *Mol Carcinog.* 7. 2015.
- CHEN YC, WU JS, YANG ST, HUANG CY, CHANG C, SUN GY, LIN TN. **Stroke, angiogenesis and phytochemicals.** *Front Biosci;* 4: 599–610. 2012.
- CHINTA SJ, GANESAN A, REIS-RODRIGUES P, LITHGOW GJ, ANDERSEN JK. **Anti-inflammatory role of the isoflavone diadzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease.** *Neurotox Res.* 23(2):145-53. 2013.
- CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. **Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells.** *Brain, Behavior, and Immunity,* v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.
- CÔTÉ M., POIRIER A.A., AUBÉ B., JOBIN C., LACROIX S., SOULET D. **Partial depletion of the proinflammatory monocyte population is neuroprotective in the myenteric plexus but not in the basal ganglia in a MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Brain, Behavior, and Immunity* 009 1-14. 2015.
- DANBOLT N C, **Glutamate uptake.** *Prog Neurobiol.* 65, 1-105, 2001.
- DAWSON T. M., KO H. S., and DAWSON V. L. **Genetic Animal Models of Parkinson's Disease,** *Neuron,* vol. 66, no. 5, pp. 646–661, 2010.

- DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. **Modeling Parkinson's Disease In Rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway.** *Exp. Neurol.* 175: 303-317. 2002.
- DEVIC IVANA, HYEJIN HWANG, JOHN SCOTT EDGAR, KENNETH IZUTSU, RICHARD PRESLAND, CATHERINE PAN, DAVID R. GOODLETT, YU WANG, JEFF ARMALY, VITOR TUMAS, CYRUS P. ZABETIAN, JAMES B. LEVERENZ, MIN SHI AND JING ZHANG. **Salivary α -synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease.** *Brain*: 134; 1-5. 2011.
- DEXTER and JENNER **Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms.** *Free Radic Biol Med.* Sep; 62: 132-44. 2013.
- DU G, ZHU H, YU P, WANG H, HE J, YE L, FU F, ZHANG J, TIAN J. **SMND-309 promotes angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells through activating erythropoietin receptor/STAT3/VEGF pathways.** *Eur J Pharmacol*; 700: 173-180. 2013.
- EDISON P, AHMED I, FAN Z, HINZ R, GELOSA G, RAY CHAUDHURI K, WALKER Z, TURKHEIMER FE, BROOKS DJ. **Microglia, Amyloid, and Glucose Metabolism in Parkinson's disease with and without Dementia.** *Neuropsychopharmacology* 38, 938-949. 2013.
- ESA, Economic and Social Affairs - United Nations. Department of Economic and Social Affairs. **Population Division. World Population Prospects: The 2008 Revision.** New York: United Nations, 2009.
- FALLEH H., OUESLATI S., GUYOT S., DALI A. B., MAGNÉ C., ABDELLY C., KSOURI R. **LC/ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte Mesembry an the mumedule L.** *Food Chemistry* 127, 1732-1738. 2011.
- FINE JM, FORSBERG AC, RENNER DB, FALTESEK KA, MOHAN KG, WONG JC, ARNESON LC, CROW JM, FREY WH, HANSON LR. **Intranasally-administered deferoxamine mitigates toxicity of 6-OHDA in a rat model of Parkinson's disease.** *Brain Res.* Jul 29; 1574: 96-104. 2014.
- FREITAS, I.; GRIFFINI, P.; BERTONE, V.; BERTONE, R.; FENOGLIO, C. ;MILLIERY, R.; VAIRETTI, M. **In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast.** *Experimental gerontology* 37, pp. 591- 602, 2002.
- FROZZA, C.O., GARCIA, C.S., GAMBATO, G., DE SOUZA, M.D., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F.F., SEIXAS, F.K., COLLARES, T., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O.A., HENRIQUES, J.A., ROESCH-ELY, M., **Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis.** *Food and Chemical Toxicology.* 52, 137-142. 2013.
- FUNAKOSHI-TAGO, M., OKAMOTO, K., IZUMI, R., TAGO, K., YANAGISAWA, K., NARUKAWA, Y., KIUCHI, F., KASAHARA, T., TAMURA, H. **Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway.** *International immunopharmacology.* Doi:10.1016/j.intimp. 2015.
- FURR SR, MARRIOTT I. **Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation.** *Frontiers in Microbiology*; 3 (201). 2012.
- GANDHI, S.; WOOD, N. W. **Molecular pathogenesis of Parkinson's disease.** *Human Molecular Genetics*, v. 14, n. 18, p. 2749-2755, 2005.
- GARCÍA M C, CINQUINA V, PALOMO-GARO C, RÁBANO A, FERNÁNDEZ-RUIZ J **Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease.** *Neuroscience Letters* 587 1-4, 2015.
- GEORGIEV D, JAHANSHAH M, DREO J, ČUŠ A, PIRTOŠEK Z, REPOV G. **Dopaminergic medication alters auditory distractor processing in Parkinson's disease.** *Acta Psychologica.* 156 45-56. 2015.
- GOMES, M. Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. **A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway.** *Brain Research*, v. 1203, p. 160-169, 2008.
- GUS, I. **Perfis de saúde – Brasil, 2006 - modificações e suas causas.** *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 88, n. 4, p. 88-91, 2007.
- HALLIWELL, B E GUTTERIDGE, JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 th edn, Oxford University Press, Oxford. 2006.
- HAN, R.M., ZHANG, J.P. and SKIBSTED L.H. **Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants Review.** *Molecules* 17, 2140-2160. 2012.

- HEISTERS, D. **Parkinson's: symptoms, treatments and research**. British Journal of Nursing, v. 20, n. 9, p. 548-554, 2011.
- HIRSCH EC, HUNOT S. **Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?** Lancet Neurol. Apr;8(4):382-97. 2009.
- HONGXING, Z., NANCAI, Y., GUOFU, H., JIANBO, S., YANXIA, W., HANJU, H., QIAN, L., MEI, M., YANDONG, Y., HAO, Y., **Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against D-galactose induced neurotoxicity**. Chem. Biol. Interact. 170, 145-152, 2007.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil**. 2010.
- JIA WC, LIU G, ZHANG CD, ZHANG SP. **Formononetin attenuates hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced apoptosis and NF- κ B activation in RGC-5 cells**. Eur Rev MedPharmacol Sci.; 18(15):2191-7. 2014.
- JIANG TIANYI, BRINTON ROBERTA DIAZ, CADENAS ENRIQUE. **PSS257 - Energy - Redox Homeostasis and Inflammation in Brain Aging: Significance of Age-Dependent Astrocyte Metabolic - Redox Profile**. Free Radical Biology and Medicine, Volume 65, Supplement 2, 1 November, Pages S115-S116, 2013.
- JING X., SHI H., ZHANG C., REN M., HAN M., WEI X., ZHANG X. AND LOU H. **Dimethyl fumarate attenuates 6-ohda-induced neurotoxicity in sh-sy5y cells and in animal model of parkinson's disease by enhancing nrf2 activity**. Neuroscience 286 131–140. 2015.
- KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. **Principles of Neural Science**, 4th ed. New York, McGraw-Hill, 2000.
- KHAN M. M., RAZA S. S., JAVED H., AHMAD A., KHAN A., ISLAM F., SAFHI M. M., ISLAM F. **Rutin Protects Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress in an Animal Model of Parkinson's Disease**. Neurotox Res 22:1–15. 2012.
- KIM D.O., LEE K.W., LEE H.J., LEE, C.Y. **Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3713–3717. 2002.
- KIRIK D, LUNDBLAD M, ANDERSSON M, WINKLER C, WIERUP N, CENCI MA. **Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease**. Eur J Neurosci. Jan; 15(1):120-32. 2002.
- KLAFKE, J.Z., DA SILVA, M.A., TREVISAN, G., ROSSATO, M.F., DA SILVA, C.R., GUERRA, G.P., VILLARINHO, J.G., RIGO, F.K., DALMOLIN, G.D., GOMEZ, M.V., RUBIN, M.A., FERREIRA, J., **Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats**. Neuroscience. 222, 136-146. 2012.
- KRÄHMER A., GUDIA, B. G., WEIHERC N., GIERUSC M., SCHÜTZED W., SCHULZA H.. **Characterization and quantification of secondary metabolite profiles in leaves of red and white clover species by NIR and ATR-IR Spectroscopy**. Vibrational Spectroscopy 68 96– 103. 2013.
- KUMAR B, KUHAD A, CHOPRA K. **Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences**. Psychopharmacology (Berl); 214: 819-28. 2011.
- LAI PK, CHAN JY, CHENG L, LAU CP, HAN SQ, LEUNG PC, FUNG KP, LAU CB. **Isolation of anti-inflammatory fractions and compounds from the root of Astragalus membranaceus**. Phytother Res; 27(4):581-7. 2013.
- LI, Z., DONG, X., ZHANG, J., ZENG, G., ZHAO, H., LIU, Y., QIU, R., MO, L., YE, Y., **Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism**. Journal of the neurological sciences. 15, 112-117. 2014.
- LI R, LIANG T, XU L, ZHENG N, ZHANG K, DUAN X **Puerarin attenuates neuronal degeneration in the substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats through regulating BDNF expression and activating the Nrf2/ARE signaling pathway**. Brain Res. 26;1523:1-9. 2013.
- LIANG K, YE Y, WANG Y, ZHANG J, LI C. **Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway**. J Neurol Sci. 15;344 (1-2):100-4. 2014.
- LIMA CAVENDISH, R., DE SOUZA SANTOS, J., BELO NETO, R., OLIVEIRA PAIXÃO, A., VALÉRIA OLIVEIRA, J., DIVINO DE ARAUJO, E., BERRETTA E SILVA, A., MARIA THOMAZZI, S., CORDEIRO CARDOSO, J., ZANARDO GOMES, M. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents**. Journal of Ethnopharmacology, v.173, p.127 - 133, 2015.

- LIU D, SHI J, IBARRA A C, KAKUDA Y, XUE S J. **The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical.** LWT - Food Science and Technology 41; 1344–1349, 2008.
- MAES M, TWISK F M, RINGEL K. **Inflammatory and cell-mediated immune biomarkers in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and depression: Inflammatory markers are higher in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome than in depression.** Psychother Psychosom. 81 (5): 286-95. 2012.
- MAHYAR E, SUDEEP S G, ALI S. **Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis.** Lancet Neurol; 4: 362–6. 2005.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., RÉMÉSY C., AND JIMENEZ L. **Polyphenols: food sources and bioavailability** Am J Clin Nutr 79, 727–47. 2004.
- MARTÍN-FERNÁNDEZ J J, MARTÍNEZ I V, DÍEZ R C **Homocysteine and Cognitive Decline in Parkinson's disease.** Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline, Chapter 47, 511–519. 2015.
- MEREDITH, G. E; SONSALLA, P.; CHESSELET, M-F. **Animal Models of Parkinson's Disease Progression.** Acta Neuropathologica, v. 115, n. 4, p. 385-398, 2008.
- MICHAUD M, BALARDY L, MOULIS G, GAUDIN C, PEYROT C, VELLAS B, CESARI M, NOURHASHEMI F. **Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases.** J Am Med Dir Assoc. Dec;14 (12):877-82. 2013.
- MILLER RL, JAMES-KRACKE M, SUN GY, SUN AY. **Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease.** Neurochem Res. Jan;34(1):55-65. 2009.
- MILOS M. and MAKOTA D. **Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction.** Food Chemistry 131, 296–299. 2012.
- MORETTI M, COLLA A, BALEN G O, BONFANTI DOS SANTOS D, BUDNI J, FREITAS A E, FARINA M, RODRIGUES ALS. **Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress.** Journal of Psychiatric Research, 46: 331-340, 2012.
- MORRONI F, SITA G, TAROZZI A, CANTELLI-FORTI G, HRELIA P. **Neuroprotection by 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate in a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease.** Brain Res. Nov 17; 1589:93-104. 2014.
- MU H, BAI YH, WANG ST, ZHU ZM, ZHANG YW. **Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover)** Phytomedicine Volume 16, Issue 4, Pages 314–319, 2009.
- NEVES L C, TOSIN J M, BENEDETTE R M, CISNEROS-ZEVALLOS L. **Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region.** Food Chemistry 174; 188–196, 2015.
- NISHIO, N., TANIGUCHI, W., SUGIMURA, Y.K., YAMANAKA, M., KIYOYUKI, Y., YAMADA, H., MIYAZAKI, N., YOSHIDA, M., NAKATSUKA, T., **Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating trpa1 and trpv1 channels.** Neuroscience. 5, 201-212. 2013.
- NUR A., NUSRAT J. and RAFIQUZZAMAN B. **Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity.** Saudi Pharmaceutical Journal. 23, 213- 224. 2012.
- OBESO, J. A.; MARIN, C.; RODRIGUEZ-OROZ, C.; BLESÁ, J.; BENITEZ-TEMIÑO, B.; MENA-SEGOVIA, J.; RODRÍGUEZ, M.; OLANOW, C. W. **Parkinson's Disease: Current Concepts and Unexplained Observations.** Annals of neurology, v. 64, 30-46, 2000.
- OBESO, J. A.; MARIN, C.; RODRIGUEZ-OROZ, C.; BLESÁ, J.; BENITEZ-TEMIÑO, B.; MENA-SEGOVIA, J.; RODRÍGUEZ, M.; OLANOW, C. W. **The Basal Ganglia in Parkinson's Disease: Current Concepts and Unexplained Observations.** Annals of neurology, v. 64, suplemento 2, p. 30-46, 2008.
- OCCHIUTO F, PALUMBO DR, SAMPERI S, ZANGLA G, PINO A, DE PASQUALE R, CIRCOSTA C. **The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. protects HCN 1-A neurons from oxidative stress.** Phytother Res. 23(2):192-6. 2009.
- O'LEARY, T.P., GUNN, R.K., BROWN, R.E. **What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice?** Behav. Genet. 43, 34-50. 2013.
- ONO K, YAMADA M. **Vitamin A potentially destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases.** Neurobiol Dis. 25 (2):446-54, 2007.
- PADOVAN-NETO FE, CAVALCANTI-KIWIATKOVSKI R, GOMES C, RUIITER O, ANSELMO-FRANCI J, DEL BEL E. **Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition**

- on the development and expression. Of L-DOPA induced dyskinesia in 6-OHDA lesioned rats. *Neuropharmacology*, v. 89, p. 87-99, 2015.
- PAN Y., ROHAN V., TIKEKARB, N. **Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds** *International Journal of Pharmaceutics* 450, 129– 137. 2013.
- PARK H J, ZHAO T T, LEE K S, LEE S H, SHIN K S, PARK K H, CHOIC H S, LEE M K. **Effects of (-)-sesamin on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells and dopaminergic neuronal cells of Parkinson's disease rat models. 3rd revised version-R3:** *Neurochemistry International*. MS No. NCI-D-14-00209. 2014.
- PAXINOS G, WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5 th ed. Academic Press, San Diego, CA. 2005.
- PETERSON, J and DWYER, J. **FLAVONOIDS: dietary occurrence and biochemical activity**. *Nutrition Research*, Vol. 18. No. 12. pp. 1995-2018; 1998.
- PENG J., OO M. L., and ANDERSEN J. K. **Synergistic effects of environmental risk factors and genemutations in Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration**. *Journal of Neurochemistry*, vol. 115, no. 6, pp. 1363–1373, 2010.
- PHANIENDRA A, JESTADI D B and PERIYASAMY L. **Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases** *Ind J Clin Biochem*; 30(1):11–26. 2015.
- PILSÁKOVÁ L, RIECANSKÝ I, JAGLA F. **Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens**. *Physiological Research*, Prague, v.59, p. 651-664. 2010.
- PRU JK. **The bone-promoting actions of formononetin in established osteopenia**. *Menopause*;19 (8):843-4. 2012.
- QUINCOZES-SANTOS A, Bobermin L D, Tramontina A C, Wartchow K M, Tagliari B, Souza D O, Wyse A T.S., Gonçalves C A. **Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol**. *Toxicology in Vitro*, Volume 28, Issue 4, June, Pages 544-551, 2014.
- RAMIREZ-GARCIA, PALAFOX-SANCHEZ V AND LIMON I. D. **Nitrosative and cognitive effects of chronic l-dopa administration in rats with intra-nigral 6-ohda lesion**. *Neuroscience* 290 492–508. 2015.
- RAO, S. S.; HOFMANN, L. A.; SHAKIL, A. **Parkinson's disease: diagnosis and treatment**. *American Family Physician*, v. 74, n. 12, p. 2046-2054, 2006.
- REDA G., FUNDAN Y., EMIRHAN N. ESRAKÜPELIAKKOL, ÝPEKSÜNTAR, HIKMETKELES, HIROJIINA, ÝHSANÇALÝP, TAYFUNERSÖZ. **Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various Trifolium L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients**. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 423–432. 2013.
- RIGHI, A.A., ALVES, T.R., NEGRI, G., MARQUES, L.M., BREYER, H., SALATINO, A., **Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91, 2363-2370. 2011.
- RIVERA P, PÉREZ-MARTÍN M, PAVÓN FJ, SERRANO A, CRESPILO A, CIFUENTES M, LÓPEZ-ÁVALOS MD, GRONDONA JM, VIDA M, FERNÁNDEZ-LLEBREZ P, DE FONSECA FR, SUÁREZ J. **Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus**. *PLoS One*. 31;8 (5), 2013.
- RODRIGUEZ, J J, YEH CY, TERZIEVA S, OLABARRIA M, KULIJEWICZ-NAWROT M, VERKHRATSKY A. **Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain**. *Neurobiol Aging*. 35, 15-23; 2014.
- ROUSE, S. T.; MARINO, M. J.; BRADLEY, S. R.; AWAD, H.; WITTMAN, M.; CONN, P. J. **Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders**. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 88, n. 3, p. 427-435, 2000.
- RUBIN, M.; GORDSTEIN, F.; RUBIN, R. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- RUBIO-OSORNIO, M.; MONTES, S.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; AGUILERA, P.; FLORIANO-SÁNCHEZ, E.; MONROY-NOYOLA, A.; RÍOS, C. **Cooper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation by MPP+ in rats**. *Neurochemistry International*, v. 4, n.7, p. 447-451, 2009.
- SAMPEDRO-PIQUERO P, DE BARTOLO P, PETROSINI L, ZANCADA-MENENDEZ C, ARIAS J L, BEGEGA A. **Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive**

- improvements after environmental enrichment in aged rats.** *Neurobiol Learn Mem.* 114, 16-25; 2014.
- SANACORA G, TRECCANI G, POPOLI M. **Towards a glutamate hypothesis of depression an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders.** *Neuropharmacology*; 62: 63-77, 2012.
- SAPOZHNIKOVA, Y. **Development of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee.** *Food Chemistry* 150 87–93. 2014.
- SATO K, SAITO H, KATSUKI H. **Synergism of tocopherol and ascorbate on the survival of cultured brain neurones.** *Neuroreport*; 4: 1179-82. 1993.
- SCHALLIER A, SMOLDERS I, DAM D, LOYENS E, DE DEYN P P, MICHOTTE Y, MASSIE A. **Region and specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis.* 24, 287-300; 2011.
- SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. **Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective.** *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.
- SCONCE M. D., CHURCHILL M. J., MOORE C. AND MESHUL C. K. **Intervention with 7,8-dihydroxyflavone blocks further striatal terminal loss and restores motor deficits in a progressive mouse model of parkinson's disease I .** *Neuroscience* 290 454–471. 2015.
- SEGOVIA G, PORRAS A, DEL ARCO A, MORA F. **Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective.** *Mech Ageing Dev.* 122, 1-29, 2001.
- SEVCSIK E, TREXLER AJ, DUNN JM, RHOADES E. **Allostery in a disordered protein: oxidative modifications to a-synuclein act distally to regulate membrane binding.** *J Am Chem Soc.* 133 (18): 7152–8, 2011.
- SINGH, N.; PILLAY, V.; YAHYA, E. C. **Advances in the treatment of Parkinson's disease.** *Progress in Neurobiology*, v. 81, n. 1, p. 29-44, 2007.
- SOUZA D G, BELLAVER B, SOUZA D O, QUINCOZES-SANTOS A. **Characterization of adult rat astrocyte cultures.** *PloS One.* 8, E60282, 2013.
- SRIVASTAVA M S LIN SM, LIU SM, LIN RH. **6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons.** *Eur. J. Pharmacol.* 5: 107-110. 2013.
- STOUT JM, KNAPP AN, BANZ WJ, WALLACE DG, CHEATWOOD JL. **Subcutaneous daidzein administration enhances recovery of skilled ladder rung walking performance following stroke in rats.** *Behav Brain Res.* 1; 256:428-31, 2013.
- SUN M S LIN SM, LIU SM, LIN RH. **6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons.** *Eur. J. Pharmacol.* 5: 107-110. 2012.
- THOO Y. Y. , ABAS F., MING LAI O., HO C W, YIN J, HEDEGAARD R V, SKIBSTED L H, TAN C P. **Antioxidant synergism between ethanolic *Centella asiatica* extracts and alpha-tocopherol in model systems.** *Food Chemistry* 138 1215–1219. 2013.
- TIAN MIN WANG, RU-FENG WANG, HU-BIAO CHEN, MING-YING SHANG, SHAO-QING CA. **Alkyl and phenolic glycosides from *Saussurea stella*.** *Fitoterapia*, Volume 88, July, Pages 38-43. 2013.
- TIEU K. **A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's disease.** Cold Spring Harb Perspect Med; 1: a 009316. 2011.
- TORRES KC, ARAÚJO PEREIRA P, LIMA GS, BOZZI IC, REZENDE VB, BICALHO MA, MORAES EN, MIRANDA DM, ROMANO-SILVA MA. **Increased frequency of T cells expressing IL-10 in Alzheimer disease but not in late-onset depression patients.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* Dec 2; 47:40-5. 2013.
- TORRES KC, LIMA GS, FIAMONCINI CM, REZENDE VB, PEREIRA PA, BICALHO MA, MORAES EN, ROMANO-SILVA MA. **Increased frequency of cluster of differentiation 14 (CD14+) monocytes expressing interleukin 1 beta (IL-1β) in Alzheimer's disease patients and intermediate levels in late-onset depression patients.** *Int J Geriatr Psychiatry.* Feb; 29 (2):137-43. 2014.
- ULATOWSKI L, PARKER R., WARRIER G., SULTANA R., BUTTERFIELD D. A., MANOR D. **Vitamin E is essential for purkinje neuron integrity.** *Neuroscience* 260 120–129, 2014.
- ULUSOY GK, CELIK T, KAYIR H, GÜRSOY M, ISIK AT, UZBAY TI. **Effects of pioglitazone and retinoic acid in a rotenone model of Parkinson's disease.** *Brain Res Bull.* 15; 85(6):380-4, 2011.
- UZOGARA S.G. **The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review**
The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnology Advances* 18, 179–206. 2000.

- VAN DEN BERG R, GUIDO R.M.M. HAENEN, VAN DEN BERG H, AALT BAST. **Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures.** Food Chemistry 66 511-517. 1999.
- WAJNER, M, LATINI, A, WYSE, AT, DUTRA-FILHO, CS. **The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies.** J Inherit. Metab. Dis. 27:427-448. 2004.
- WAKADE C, CHONG R. **A novel treatment target for Parkinson's disease.** Review article. Journal of the Neurological Sciences 347 34–38. 2014.
- WANG A, COSTELLO S, COCKBURN M, ZHANG X, BRONSTEIN J, RITZ B **Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides.** Eur J Epidemiol 26:547–555. 2011.
- WANG, W.; BU, B.; XIE, M.; ZHANG, M.; YU, Z.; TAO, D. **Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases.** Progress in neurobiology, v. 89, n. 1, p. 1-17, 2015.
- WANG, Y., ZHU, Y., GAO, L., YIN, H., XIE, Z., WANG, D., ZHU, Z., HAN, X., **Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells.** Molecules. 17, 10052-10064. 2012.
- WICHMANN, T.; DELONG, M. R. **Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease.** Advances in Neurology, v. 91, p. 9-18, 2003.
- WILLARD AM, BOUCHARD RS, GITTIS AH **Differential degradation of motor deficits during gradual dopamine depletion with 6-hydroxydopamine in mice.** Neuroscience. Aug 20; 301:254-67; 2015.
- WINKLER C, KIRIK D, BJÖRKLUND A, CENCI MA **L-DOPA-induced dyskinesia in the intra striatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function.** Neurobiol Dis. Jul; 10(2):165-86. 2002.
- WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H-O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. **Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence.** European Journal of Epidemiology, v. 26, suplemento 1, p. 1-58, 2011.
- WOOTTON-BEARD P C., MORAN A, RYAN L. **Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods** Food Research International 44 217–224. 2011.
- WOOTTON, BARBA P and RYAN L. **Combined use of Multiple Methodologies for the Measurement of Total Antioxidant Capacity in UK Commercially Available Vegetable Juices.** Plant Foods Hum Nutr 67:142–147. 2012.
- WU Y.N. and JOHNSON S.W. **Dopamine oxidation facilitates rotenone-dependent potentiation of N-methyl-d-aspartate currents in rat substantia nigra dopamine neurons.** Neuroscience, vol. 195, pp. 138–144, 2011.
- XIMENES JC, NEVES KR, LEAL LK, DO CARMO MR, BRITO GA, NAFFAH-MAZZACORATTI MDA G, CAVALHEIRO ÉA, VIANA GS **Valproic Acid Neuroprotection in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Is Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and HDAC Inhibitory Properties.** J Neurodegener Dis. Vol.15 pp.1-14 2015.
- YAMAGATA K., TAGAMI M. AND YAMORI Y. **Neuronal vulnerability of stroke-prone spontaneously hypertensive rats to ischemia and its prevention with antioxidants such as vitamin E.** Neuroscience 170 1–7. 2010.
- YANG SH, LIAO CC, CHEN Y, SYU JP, JENG CJ, WANG SM. **Daidzein induces neuritogenesis in DRG neuronal cultures.**J Biomed Sci. 29;19:80, 2012.
- YIN LH, SHEN H, DIAZ-RUIZ O, BÄCKMAN CM, BAE E, YU SJ, WANG Y. **Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease.** BMC Neurosci. 6; 13: 120, 2012.
- YOKOYAMA, H.; KUROIWA, H.; KASAHARA, J.; ARAKI, T. **Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease.** Acta Neurobiologia e Experimentalis, v. 71, n. 2, p. 269-280, 2011.
- YOU L.H., LI F, WANG L, ZHAO S.E, WANG S.M., L., ZHANG L., ZHANG L.H., DUAN X.L., YU P., AND CHANG Y.Z. **Brain iron accumulation exacerbates the pathogenesis of mptp-induced parkinson's disease** Neuroscience 284 234–246. 2015.
- ZASLAVSKY, C.; GUS, I. **Idoso: Doença cardíaca e comorbidades.** Arq. Bras.Cardiol, v. 79. n. 6. p. 635-639, 2002.
- ZHANG, JIAHENG ZHANG, FENGPEI DU, BING PENG, RUNHUA LU, HAIXIANG GAO, ZHIQIANG ZHOU. **Structure, electronic properties, and radical scavenging mechanisms of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A: A density functional study** Journal of Molecular Structure: THEOCHEM 955 1–6. 2010.

- ZHAO M, ZHAN W, CHANG J, WANG J, ZHENG W, YANG Y, WEN P, LI M, XIAO H **Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease.** Neuroscience Letters 584 184–189. 2015.
- ZHU, H., ZOU, L., TIAN, J., LIN, F., HE, J., HOU, J., **Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury.** Planta Medica. 80, 262-268. 2014.
- ZUGNO, AI, OLIVEIRA, DL, SCHERER, EBS, WAJNER, M, WOFCHUK, S, WYSE, **Parkinson's disease.** Neuroscience Letters ATS. 304-317. 2007.

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Desenvolvimento de um composto antioxidante de vitaminas A, C, E e formononetina na profilaxia e terapêutica da doença de Parkinson

Pesquisador Responsável Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira

Data da Versão 06/02/2012

Cadastro 020912

Data do Parecer 27/06/2013

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

No objetivo geral do projeto pretende-se a análise comparativa das propriedades antioxidantes de vitaminas, da formononetina, de forma isolada, assim como a combinação dessas, com a finalidade de desenvolvimento e formulação de um possível composto vitamínico a ser utilizado na terapêutica e profilaxia da doença de Parkinson.

Sumário do Projeto

Nessa pesquisa, pretende-se a análise comparativa das propriedades antioxidantes de vitaminas, como o A, C, E, e princípios ativos da própolis vermelha, a exemplo de Formononetina, de forma isolada e a combinação dessas, com a finalidade de desenvolvimento e formulação de um possível composto vitamínico a ser utilizado na terapêutica e profilaxia de doenças neurodegenerativas; especificadamente da doença de Parkinson. Proceder-se-á a análises in vitro da atividade antioxidante das diferentes vitaminas e de princípios ativos da própolis vermelha, isolados e em combinação, utilizando o método do DPH, ABTS e FRAP. Após a formulação das melhores combinações, será realizada administração por via oral in vivo em modelo animal. Os resultados serão caracterizados a partir da análise do comportamento e de alterações estruturais e funcionais nos encéfalos de roedores (modificações na expressão das enzimas tirosina-hidroxilase e sintase do óxido nítrico), após a lesão pela aplicação intracerebral da neurotoxina 6-hidroxidopamina, modelo experimental para estudo da doença de Parkinson.

| Itens Metodológicos e Éticos | Situação |
|------------------------------------|---------------------|
| Título | Adequado |
| Autores | Adequados |
| Local de Origem na Instituição | Adequado |
| Projeto elaborado por patrocinador | Não |
| Aprovação no país de origem | Não necessita |
| Local de Realização | Própria instituição |
| Outras instituições envolvidas | Não |
| Condições para realização | Adequadas |

Comentários sobre os itens de Identificação

| Introdução | Comentário |
|------------|------------|
|------------|------------|

Comentários sobre a Introdução

Texto bem fundamentado abordando a utilização do produto a ser estudado.

| Objetivos | Adequados |
|-----------|-----------|
|-----------|-----------|

Comentários sobre os Objetivos

| Pacientes e Métodos | |
|--|----------------|
| Delineamento | Comentário |
| Tamanho de amostra | Total 48 Local |
| Cálculo do tamanho da amostra | Adequado |
| Participantes pertencentes a grupos especiais | Não |
| Seleção equitativa dos indivíduos participantes | Adequada |
| Crêterios de inclusão e exclusão | Ausentes |
| Relação risco- benefício | Adequada |
| Uso de placebo | Não utiliza |
| Período de suspensão de uso de drogas (wash out) | Não utiliza |

| | |
|------------------------------------|-------------------------|
| Monitoramento da segurança e dados | Não se aplica |
| Avaliação dos dados | Adequada - quantitativa |
| Privacidade e confidencialidade | Adequada |
| Termo de Consentimento | Não se aplica |
| Adequação às Normas e Diretrizes | Sim |

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

| | |
|--------------------------------|---------------|
| Cronograma | Adequado |
| Data de início prevista | 01/07/2013 |
| Data de término prevista | 01/12/2013 |
| Orçamento | Ausente |
| Fonte de financiamento externa | Não Informado |

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

| | |
|----------------------------|-----------|
| Referências Bibliográficas | Adequadas |
|----------------------------|-----------|

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

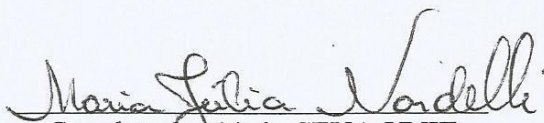
A proposta tem mérito científico, relevância para a pesquisa e apresenta-se dentro dos critérios éticos em experimentação animal.



UNIVERSIDADE TIRADENTES
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, “Desenvolvimento de um composto antioxidante de vitaminas A, C, E e formononetina na profilaxia e terapêutica da doença de Parkinson”, processo nº 020912, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pelo pesquisador **Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 27 de junho de 2013.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT

APÊNDICE 1 - ARTIGO DERIVADO DA TESE

PUBLICADO

Journal of Ethnopharmacology (Qualis B1; fator de impacto 2,88)

Journal of Ethnopharmacology 173 (2015) 127–133



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents



Rodrigo Lima Cavendish^a, Jandson de Souza Santos^b, Reinaldo Belo Neto^a,
Ailma Oliveira Paixão^a, Juciele Valéria Oliveira^a, Edilson Divino de Araujo^c,
Andresa Aparecida Berretta e Silva^d, Sara Maria Thomazzi^{b,*}, Juliana Cordeiro Cardoso^a,
Margarete Zanardo Gomes^a

^a Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490 Aracaju, Sergipe, Brazil

^b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^c Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^d Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Av. do Café, CEP 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015

Received in revised form

20 June 2015

Accepted 16 July 2015

Available online 17 July 2015

Keywords:

Propolis

Analgesics

Flavonoids

Formononetin

Inflammation.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Propolis has been used as a folk medicine for centuries around the world due to its wide spectrum of biological activities. The red propolis, a new Brazilian variety of this apimaterial, has presented an unusual chemical composition, including isoflavones such as formononetin and biochanin A. Since both the green and red varieties of propolis are traditionally used as medicine and commercialized with no label differentiation, the study of the activities of red propolis extract has become important in order to clarify whether this product has the same activities as commercial ones. In this work, we demonstrated the potential action of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) and its biomarker, formononetin, as antinociceptive and anti-inflammatory drugs on experimental models. **Materials and methods:** The HERP was chemically characterised by HPLC/DAD analyses. The biological activities of the HERP (3, 10, and 30 mg/kg) and formononetin (10 mg/kg) were evaluated using the antinociceptive (acetic acid, formalin, and glutamate injections) and anti-inflammatory (carrageenan-induced hindpaw oedema and peritonitis) models in mice after oral administration. The open field test was also performed.

Results: Formononetin, one of the main biomarker of red propolis, was identified in the HERP (21.62 mg/g). Pretreatment with the HERP (10 and 30 mg/kg) and formononetin (10 mg/kg) produced reduction ($P < 0.001$) in the number of abdominal writhes, but the HERP was more effective ($P < 0.001$) than formononetin. In the formalin test, all HERP doses (3, 10, and 30 mg/kg, $P < 0.001$) inhibited the late phase (inflammatory pain) of formalin-induced licking, but the inhibition of neurogenic pain was observed only when the higher doses (10 and 30 mg/kg; $P < 0.05$) were used. Formononetin caused inhibition ($P < 0.001$) only in the second phase of formalin-induced nociception similarly at all HERP doses in the same phase of the test. The responses in glutamate-induced model presented crescent inhibition ($P < 0.05$) with 10 and 30 mg/kg of HERP. Also, formononetin inhibited ($P < 0.001$) the nociception induced by glutamate similarly to 30 mg/kg of HERP. There were no significant differences in the open field test after HERP administration, but formononetin decrease the spontaneous motor behaviour. Regarding the anti-inflammatory assessment, the HERP (10 and 30 mg/kg, $P < 0.05$) and formononetin ($P < 0.001$) treatments caused a significant inhibition of the oedema response. All doses of HERP (3, 10, and 30 mg/kg, $P < 0.05$) and formononetin ($P < 0.001$) also inhibited the carrageenan-induced leukocyte migration. In both cases, the results for the HERP at 30 mg/kg and formononetin were similar.

Abbreviations: ASA, acetylsalicylic acid; CI 95%, 95% confidence interval; Dexam, dexamethasone; ED₅₀, median effective dose; FOR, formononetin; HERP, hydroalcoholic extract of red propolis; IL, interleukin; Morph, morphine; NF-κB, nuclear factor-κB; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; ROS, reactive oxidative species; TNF, tumor necrosis factor; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1

* Correspondence to: Department of Physiology, Center of Biological and Health Sciences Federal University of Sergipe, 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil. Fax: +55 79 21056474.

E-mail address: sthomazzi@gmail.com (S. Maria Thomazzi).

APÊNDICE 2 - PATENTE DERIVADA DA TESE

DEPOSITADA

(54) **Título:** FORMULAÇÕES DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA E ISOFLAVONÓIDES, PREDOMINANTEMENTE FORMONONETINA COM FINALIDADE ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA, ANTI-INFLAMATÓRIA E NEUROPROTETORA.

(51) **Int.Cl.:** A61P 25/16; A61P 25/28; A61P 29/00 e A61K 8/08

(73) **Titular(es):** Instituto Tecnológico e de Pesquisa da Universidade Tiradentes (ITP/UNIT)

(72) **Inventor (es):** Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira; Margarete Zanardo Gomes; Juliana Cordeiro Cardoso; Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Sara Maria Thomazzi, Sheilla da Silva Barroso e Fanildes Silva Moraes dos Santos.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÕES DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA E ISOFLAVONÓIDES, PREDOMINANTEMENTE FORMONONETINA COM FINALIDADE ANTIOXIDANTE, ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA E NEUROPROTETORA. Esta invenção se refere a formulações contendo substâncias ativas obtidas a partir de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) ou formononetina (7-Hidroxi-4'-methoxisoflavona). Adicionalmente, esta invenção se refere a composições as quais compreendem extrato de própolis vermelha (conjunto de isoflavonas), ou um sistema de suspensão de formononetina de forma isoladas, associadas e/ou incorporadas por excipiente, com ação antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e neuroprotetora em mamíferos. As composições foram adequadas para administração por via oral e intraperitoneal, respectivamente. As formulações propostas na invenção apresentam aplicação na indústria farmacêutica, principalmente devido a atividades antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e neuroprotetora.